



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Entwicklung eines Immuno-chips zur simultanen Detektion von
Antikörpern gegen zoonotische Pathogene in Schweineseren am
Beispiel des Hepatitis E-Virus und *Yersinia* spp.**

Klaus Wutz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grads eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner

2. apl. Prof. Dr. Peter Bruno Lippa

Die Dissertation wurde am 22.10.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 04.02.2014 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2010 bis Januar 2013 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter der Leitung von o. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden durch ein Projekt (AZ-963-11) der Bayerischen Forschungsstiftung finanziell gefördert.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Die vielfältigen Projekte in allen Bereichen der Umweltanalytik haben mir in der Zeit am Institut interessante Einblicke in verschiedenste analytische Methoden gewährt. Gerade der interdisziplinäre Austausch führte immer wieder zu neuen Sichtweisen auf analytische Fragestellungen.

Bei Herrn Dr. Michael Seidel möchte ich mich für die interessanten Projekt- und Themenstellungen bedanken, die ich im Rahmen der Promotion bearbeiten konnte. Darüber hinaus bedanke ich mich für die große Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Frau Christina Nölting gilt mein Dank für die Betreuung des BFS-Projekts von Seiten der Firma Mikrogen und die bestmögliche Beantwortung meiner vielen und teils auch kritischen Fragen. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Michael Mayer und Herrn Dr. Friedhelm Struck für ihre Tipps und Ratschläge zur Behandlung der Antigene danken.

Bei Frau Dr. Silke Wacheck vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Tierärztlichen Fakultät der LMU München möchte ich mich für die Bereitstellung und Testung der in der Arbeit verwendeten Seren bedanken. Die Zusammenarbeit innerhalb des Projektes hat mir die Möglichkeit gegeben, interessante Einblicke in die Veterinärmedizin zu gewinnen.

Herrn Florian Hauke danke ich für seine stets unkomplizierte Hilfe und Unterstützung bei allen technischen Problemen und Reparaturarbeiten am Messgerät im Rahmen des Kooperationsprojektes mit der Firma GWK Präzisionstechnik. Seine Geduld, sich allen Mängeln und Macken des Geräts anzunehmen, hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Innerhalb des Instituts bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen und Kolleginnen, von denen jeder einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat, ob durch fachliche Hilfe, durch die motivierende Arbeitsatmosphäre oder in geselliger Runde.

Dabei möchte ich mich besonders bei Jan-Christoph Wolf, Susanna Mahler, Xaver Karsunke, Johannes Schmid und Susanna Oswald bedanken, die mir sowohl bei fachlichen Problemen als auch bei privaten Herausforderungen immer mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen. Jan-Christoph danke ich für seine Freundschaft, seinen ungetrübten Optimismus in allen Lebenslagen und für unsere Freizeitaktionen. Bei Susi Mahler möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanken, sowohl für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Laborarbeiten, bei denen drei oder vier Hände gefragt waren oder einfach ein guter Ratschlag aus langjähriger Laborerfahrung, als auch für die Gespräche während unserer Espresso-Pausen. Xaver Karsunke danke ich für die vielen interessanten Diskussionen und Gespräche über Gott und die Welt und den „heißen“ Draht nach China. Auch bei Johannes Schmid möchte ich mich für seine freundschaftliche Unterstützung bedanken, sei es bei organisatorischen Angelegenheiten am IWC oder auch beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein herzliches Dankeschön geht an Susi Oswald für ihre stets gute Laune im Labor und außerhalb und natürlich an ihre Kochkünste, an denen ich in vielen Mittagspausen teilhaben durfte.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Sandra Lengger und Agathe Szkola für ihre Unterstützung und freundschaftliche Hilfe innerhalb der Arbeitsgruppe sowie bei Maria Hübner und Verena Meyer für ihre tatkräftige Unterstützung im Rahmen ihrer Masterarbeiten. Mein Dank geht ebenso an Catharina Großmaß, Katharina Freitag, Robert Reich und besonders Armin Siebel für ihre Beiträge zu dieser Arbeit im Rahmen ihrer Forschungspraktika.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich den Gruppenleitern Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp und Herrn Dr. Christoph Haisch sowie Sebastian Wiesemann aussprechen, die mich fortwährend mit Ratschlägen fachlicher und persönlicher Art unterstützt haben.

Auch bei der Stammtischrunde und meinen Kollegen und Ex-Kollegen Gabi Hörnig, Gerhard Pappert, Kathrin Schwarzmeier, Jimena Saucedo-Friebe, Clemens Helmbrecht, Henrike Blatt, Michael Pschenitza, Sebastian Wohlfahrt, Benedikt Grob sowie Maria und Markus Knauer bedanke ich mich für die Abende in geselliger Runde und die gute Atmosphäre während der gemeinsamen Laborzeit. Ebenso danke ich meinen langjährigen Studienfreunden Florian Schweinberger, Michaela Maier und Konrad Hindelang für die spontanen Treffen und Gespräche.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und ihren Zuspruch während der nicht immer leichten Jahre der Promotion.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wutz, K., Meyer, V. K., Wacheck, S., Krol, P., Gareis, M., Nölting, C., Struck, F.; Soutschek, E., Böcher, O., Niessner, R., Seidel, M., *New Route for Fast Detection of Antibodies against Zoonotic Pathogens in Sera of Slaughtered Pigs by Means of Flow-through Chemiluminescence Immuno-chips*, Analytical Chemistry **2013**, 85, 5279-5285.

Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG | 1 |
| 2 | THEORETISCHER HINTERGRUND | 7 |
| 2.1 | ZOONOTISCHE PATHOGENE UND IHRE RISIKEN | 8 |
| 2.1.1 | Zoonotische Pathogene, ihre Verbreitung und ihre Überwachung | 8 |
| 2.1.2 | Relevante Zoonosen in der Schweinefleischproduktion..... | 13 |
| 2.1.2.1 | Allgemeine Informationen zum Lebensmittel Schwein und seiner Kontrolle | 13 |
| 2.1.2.1 | Das Schwein als Reservoir von Zoonoseerregern..... | 14 |
| 2.1.3 | Das Hepatitis E-Virus (HEV) und sein zoonotisches Potenzial..... | 19 |
| 2.1.3.1 | Taxonomie und Struktur von HEV | 19 |
| 2.1.3.2 | Epidemiologie und Reservoir von HEV | 21 |
| 2.1.3.3 | Nachweismethoden für HEV | 26 |
| 2.2 | IMMUNOASSAYS ALS ANALYSEN METHODE | 28 |
| 2.2.1 | Klassen und Eigenschaften von Antikörpern..... | 29 |
| 2.2.2 | Immunologische Methoden und Formate..... | 32 |
| 2.2.3 | Mikroarray-Technologie..... | 40 |
| 2.2.3.1 | Allgemeine Grundlagen der Oberflächenchemie von Mikroarray-Chips..... | 41 |
| 2.2.3.2 | Immobilisierung von Proteinen..... | 44 |
| 2.2.3.3 | Technische Realisierung der Immobilisierung..... | 47 |
| 2.2.3.3 | Detektionsverfahren | 51 |
| 2.3 | DER MCR 3 ALS MESSPLATTFORM ZUR DURCHFÜHRUNG MIKROARRAY-BASIERTER IMMUNOASSAYS | 56 |
| 2.3.1 | Messprinzip und Aufbau des MCR 3 | 57 |
| 2.3.1.1 | Mikrofluidik und Durchfluss-Mikroarray-Immunoassays..... | 57 |
| 2.3.1.2 | Aufbau des MCR 3..... | 59 |
| 2.3.2 | Datenauswertung der Messbilder | 61 |
| 3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 64 |
| 3.1 | VORUNTERSUCHUNGEN ZUR ASSAY-ENTWICKLUNG FÜR DEN NACHWEIS VON HEV-ANTIKÖRPERN IN SCHWEINESEREN MITTELS ANTIGEN-BASIERTER IMMUNOCHIPS | 65 |
| 3.1.1 | Entwicklung eines geeigneten Messprogramms am MCR 3 | 66 |
| 3.1.1.1 | Assay-Prinzip und Setup des MCR 3 | 66 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.1.1.2 | Verwendete Reagenzien und Puffer | 68 |
| 3.1.1.3 | Assay-Durchführung und Experimente zur Optimierung der Inkubationsbedingungen..... | 72 |
| 3.1.2 | Experimentelle Untersuchung der HEV-Antigen-Aktivitäten unter verschiedenen Pufferbedingungen | 78 |
| 3.1.3 | Test auf Regenerierbarkeit von HEV rAg-Mikroarrays | 87 |
| 3.1.3.1 | Voraussetzungen für einen regenerierbaren Durchfluss-Mikroarray-Chip..... | 87 |
| 3.1.3.2 | Experimente zur Regenerierbarkeit von HEV rAg-Mikroarrays | 89 |
| 3.1.4 | Test auf Lagerstabilität von HEV rAg-Mikroarrays | 93 |
| 3.2 | ETABLIERUNG EINER OBERFLÄCHENSTRATEGIE ZUR IMMOBILISIERUNG REKOMBINANTER ANTIGENE AUF MODIFIZIERTEN GLASOBERFLÄCHEN..... | 96 |
| 3.2.1 | Herstellung geeigneter Mikroarray-Oberflächen | 96 |
| 3.2.2 | Vergleich der adsorptiven und kovalenten Immobilisierung von HEV-Antigenen ... | 101 |
| 3.2.2.1 | Vorversuche zur Etablierung eines einheitlichen Inaktivierungsprotokolls | 102 |
| 3.2.2.2 | Vergleich von Polystyrol-, Epoxy-PEG- und NHS-Amid-Mikroarrays..... | 103 |
| 3.2.2.3 | Optimierung der Oberflächenbehandlung der rAg-Mikroarray-Chips | 108 |
| 3.2.3 | Untersuchung der Signalstabilität von Antigen-Immuno-chips | 110 |
| 3.2.3.1 | Generelle Aspekte zur Beurteilung der Signalstabilitäten von rAg- Immuno-chips auf Basis von Durchfluss-Mikroarrays..... | 111 |
| 3.2.3.2 | Bestimmung der optimalen HEV-Antigen-Konzentration | 113 |
| 3.2.3.3 | Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen mit optimierten rAg- Immuno-chips am MCR 3..... | 118 |
| 3.3 | NACHWEIS VON IgG-ANTIKÖRPERN GEGEN ZOONOTISCHE PATHOGENE MITTELS IMMUNOCHIPS AM BEISPIEL VON HEV UND <i>YERSINIA</i> spp. | 127 |
| 3.3.1 | Etablierung eines Cut-Off-Wertes für die Positiv/Negativ-Diskriminierung | 129 |
| 3.3.1.1 | Der Cut-Off-Wert als Entscheidungskriterium in der immunoanalytischen Diagnostik..... | 129 |
| 3.3.1.2 | Leerwert-Messungen zur Berechnung von Cut-Off-Werten für anti-HEV IgG und anti- <i>Yersinia</i> IgG | 136 |
| 3.3.2 | Titrationsexperimente zur Ermittlung des Ansprechverhaltens des Immuno-chips | 143 |
| 3.3.2.1 | Methoden zum Vergleich des Ansprechverhaltens des Immuno-chips | 145 |
| 3.3.2.2 | Auswahl eines geeigneten Verdünnungsmediums für die Titrationsexperimente | 147 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.3.2.3 | Vergleichende Untersuchung des Ansprechverhaltens von Immunoassays zum Nachweis von anti-HEV IgG und anti- <i>Yersinia</i> IgG..... | 149 |
| 3.3.3 | Screening von Schweineseren auf IgG-Antikörper gegen HEV und <i>Yersinia</i> spp. | 155 |
| 3.3.3.1 | Screening von Schweineseren auf anti-HEV IgG | 155 |
| 3.3.3.2 | Screening von Schweineseren auf anti- <i>Yersinia</i> IgG | 160 |
| 3.3.3.3 | Paralleles Screening auf anti-HEV und anti- <i>Yersinia</i> IgG..... | 162 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 166 |
| 5 | SUMMARY AND OUTLOOK | 172 |
| 6 | EXPERIMENTELLER TEIL..... | 177 |
| 6.1 | VERWENDETE MATERIALIEN..... | 178 |
| 6.1.1 | Geräte und Materialien | 178 |
| 6.1.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 179 |
| 6.1.3 | Software..... | 180 |
| 6.1.4 | Chemikalien und Reagenzien | 181 |
| 6.1.4.1 | Chemikalien | 181 |
| 6.1.4.2 | Antikörper und Antigene | 182 |
| 6.1.4.3 | Probenmaterial | 183 |
| 6.1.4.4 | Verwendete Pufferlösungen..... | 184 |
| 6.2 | HERSTELLUNG VON PROTEIN-MIKROARRAYS | 187 |
| 6.2.1 | Herstellung von Amino-PEG-Chipoberflächen (SOP für 20 Chips)..... | 187 |
| 6.2.1.1 | Vorbereitung und Reinigung..... | 187 |
| 6.2.1.2 | Anätzung der Oberfläche..... | 187 |
| 6.2.1.3 | Silanisierung mit GOPTS | 187 |
| 6.2.1.4 | Beschichtung mit Diamino-PEG | 188 |
| 6.2.2 | Aktivierung von Amino-PEG-Chipoberflächen (SOP für 20 Chips) | 188 |
| 6.2.2.1 | Kopplung des Diepoxy-PEGs | 188 |
| 6.2.2.2 | Aktivierung von Amino-PEG-Chips mit DSC..... | 188 |
| 6.2.3 | Immobilisierung der rekombinanten Antigene und Kontrollantikörper | 189 |
| 6.2.3.1 | Vorbereitung der Spottinglösungen..... | 189 |
| 6.2.3.2 | Einstellungen und Durchführung des Spottingprozesses..... | 190 |
| 6.2.4 | Inaktivierung der Antigen-Mikroarray-Chipoberflächen | 192 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.2.5 | Fertigung der Mikroarray-Durchflussmesszellen..... | 193 |
| 6.3 | MESSUNGEN MIT SCHWEINESEREN AM MCR 3 | 193 |
| 6.3.1 | Durchführung und Messprogramm | 193 |
| 6.3.2 | Untersuchung von Signal- und Lagerstabilitäten | 195 |
| 6.3.3 | Verdünnungsexperimente und Serenscreening | 196 |
| 6.4 | ELISA-MESSUNGEN VON SCHWEINESEREN..... | 197 |
| 6.4.1 | Durchführung eines Mikrotiterplatten-ELISAs (SOP)..... | 197 |
| 6.4.1.1 | Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Antigenen | 197 |
| 6.4.1.2 | Inaktivierung..... | 197 |
| 6.4.1.3 | Inkubation mit Serumprobe | 197 |
| 6.4.1.4 | Zugabe des Detektionsantikörpers | 198 |
| 6.4.1.5 | Zugabe der Farbsubstrate und Bildauswertung..... | 198 |
| 6.4.2 | Untersuchung der Antigen-Aktivitäten | 198 |
| 6.4.3 | Verdünnungsexperimente und Serenscreening..... | 199 |
| 6.5 | LIA-MESSUNGEN VON SCHWEINESEREN | 199 |
| 6.5.1 | Durchführung eines LIAs (SOP)..... | 199 |
| 6.5.1.1 | Inkubation mit Serumprobe | 200 |
| 6.5.1.2 | Zugabe des Detektionsantikörpers | 200 |
| 6.5.1.3 | Zugabe der Farbsubstrate und Auswertung | 200 |
| 6.5.2 | Verdünnungsexperimente und Serenscreening..... | 200 |
| 6.6 | MESSUNGEN VON SCHWEINESEREN MIT ELISA-KIT PIGTYPE YERSINIA AB | 201 |
| 6.6.1 | Durchführung der ELISA-Messungen | 201 |
| 6.6.1.1 | Inkubation mit Serumprobe | 201 |
| 6.6.1.2 | Zugabe des Detektionsantikörpers | 201 |
| 6.6.1.3 | Farbreaktion und Auswertung..... | 201 |
| 6.6.2 | Verdünnungsexperimente und Serenscreening..... | 202 |
| 7 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 203 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 207 |
| 9 | ANHANG..... | 237 |

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Analytische Chemie ist in vielerlei Hinsicht aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Integrierte analytische Messsysteme sind mittlerweile für die Optimierung und Überwachung komplexer industrieller Produktionsabläufe von der Herstellung von Haushaltsgegenständen bis hin zu Medikamenten ein unverzichtbarer Bestandteil der Prozess- und Qualitätskontrolle. Ein gesellschaftliches und politisches Hauptanliegen unserer Zeit ist die Sicherung und Verbesserung der menschlichen Gesundheit und die Erkennung von Umweltgefährdungen aller Art. Hier ist die Analytische Chemie insbesondere im Bereich der Lebensmittelsicherheit ein wichtiges Werkzeug, um gesundheitsgefährdende Partikel und Stoffe aus unterschiedlichsten Matrices zu detektieren und qualitative und/oder quantitative Informationen über die gefundenen Kontaminationen im Hinblick auf Vorkommen und Konzentrationsbereiche zu liefern. Dies betrifft die Exposition des Konsumenten gegenüber anorganischen Schadstoffen (z.B. Schwermetalle), organischen Komponenten (z.B. PAHs, Pestizide) wie auch mikrobiologischen Kontaminationen (Pathogene und deren Toxine). Für viele bekanntermaßen gesundheitsgefährdende Stoffe gibt es EU-weite oder nationale Grenzwerte und Normen, die von den Herstellern und Arbeitgebern zum Schutz von Arbeitnehmern und Konsumenten eingehalten werden müssen. Um diese Normen effektiv überwachen zu können, müssen daher Messmethoden entwickelt und validiert werden, die nach Möglichkeit mehrere Analyten gleichzeitig, in kurzer Zeit und mit geringem Kostenaufwand sicher erkennen.

Im Bereich des Gesundheitsschutzes stellen Infektionskrankheiten mit weltweit ca. 15 Millionen Todesfällen pro Jahr bei einem Anteil von ca. 25 % an allen Todesfällen ein bedeutendes Risikopotenzial dar (Benninger, 2011). Die Kontrolle bzw. Eindämmung von Infektionen besitzt daher sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern höchste Priorität. Infektionen können durch vielerlei bakterielle Erreger, Viren und Parasiten hervorgerufen werden. Die große Anzahl an Infektionserregern mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften hat zur Folge, dass die Prävention, Überwachung und Kontrolle eine globale Aufgabe ist, die aufgrund der schnellen und schwer zu kontrollierenden Verbreitungswege eine sehr komplexe Herausforderung darstellt. Zwar können heutzutage viele bakterielle Infektionen mit Antibiotika effektiv behandelt werden, allerdings zeigt sich in Form von vermehrt auftretenden Resistenzen die Schwäche dieses Ansatzes, der durch den Selektionsdruck zur Beschleunigung der Mutationsraten beiträgt (Cohen, 2000; Morse, 1995). Daher kommt der Prävention von humanen Infektionen eine besondere Rolle zu.

Erschwert wird die Unterbindung von Neuansteckungen durch die Tatsache, dass ein Großteil der humanpathogenen Erreger nicht ausschließlich beim Menschen vorkommt, sondern auch in verschiedenen Tieren existent ist, so dass die Verbreitung von Pathogenen auch durch tierische Krankheitsträger und Vektoren stark beeinflusst wird (Christou, 2011). Krankheitserreger, die vom Tier auf den Menschen und umgekehrt übertragen werden können, werden als Zoonoseerreger bezeichnet, die in diesem Zusammenhang auftretenden Infektionen als Zoonosen. Bekannte Erreger, bei denen das zoonotische Potenzial bereits aus ihrem Namen hervorgeht, sind der Fuchsbandwurm und die Influenza-Viren als Auslöser der Schweine- und der Geflügelgrippe.

Grundsätzlich wird bei zoonotischen Infektionen unterschieden, ob die Erreger durch direkten Kontakt mit Nutz- und Haustieren übertragen werden oder nach Verzehr verseuchter Lebensmittel (*foodborne zoonoses*).

Oft sind die Symptome und Behandlungsansätze von humanen Infektionen gut aufgeklärt, die Epidemiologie des jeweiligen Erregers ist dagegen noch lückenhaft. Gerade der menschliche Einfluss auf die Verbreitung von Erregern infolge des globalen Personen- und Warentransfers führt zu neuen Infektionsrisiken in Regionen, in denen der Erreger ursprünglich nicht heimisch war (Morse, 1995). Gleiches gilt für die Einflüsse des Klimawandels, der auch in Bezug auf Europa dazu führt, dass Tierarten mittlerweile in Regionen geeignete Lebensbedingungen vorfinden, die dort vor einigen Jahren noch nicht gegeben war (Achilles, 2009; Mills, 2010). Da gerade Insekten häufig als schwer kontrollierbare Vektoren von Viren und Bakterien dienen, ergeben sich daraus neue Gesundheitsrisiken. Ein Beispiel für dieses Gefahrenpotenzial ist das in den deutschen Medien aktuell diskutierte verstärkte Auftreten von Mücken, die ursprünglich in tropischen Klimazonen heimisch sind. So könnten in naher Zukunft in Mitteleuropa Zoonosen verursacht durch das Dengue- oder West-Nil-Virus auftreten. In Ländern, in denen schlechte sanitäre und hygienische Bedingungen herrschen, ist die Ansteckung mit Pathogenen auf fäkal-oralem oder direktem Übertragungsweg schwer zu vermeiden. Der mit dem stetigen Bevölkerungswachstum in Entwicklungsländern einhergehende steigende Bedarf an Lebensmitteln wird in Zukunft zu einer Vergrößerung der Nutztierbestände in Massentierhaltung führen. Der dabei kaum zu vermeidende immer engere Kontakt von Mensch und Tier untereinander ist eine weitere Quelle von Zoonosen, der ein wichtiges Augenmerk in der aktuellen und zukünftigen Weltgesundheitspolitik gebührt. Nicht zu unterschätzen ist auch das potentielle Risiko infolge einer künstlichen Freisetzung gefährlicher Erreger als mikrobiologische Waffen (Ryan, 2008).

Monitoring- und Bekämpfungsprogramme für Zoonoseerreger fallen in die Aufgabenbereiche der Veterinärmedizin, der Humanmedizin sowie der Lebensmittelanalytik, was eine interdisziplinäre Vernetzung erfordert. Auf europäischer Ebene sind hier die *European Food Safety Authority* (EFSA) und das *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) die übergeordneten Gremien, die EU-Regularien zur Kontrolle von Infektionskrankheiten und Zoonosen erarbeiten. In Deutschland sind die für ihren jeweiligen Fachbereich anerkannten Forschungsinstitute wie das Robert-Koch-Institut, das Paul-Ehrlich-Institut, das Friedrich-Löffler-Institut und das Bundesamt für Risikobewertung in die europäischen und nationalen Monitoring-Programme miteingebunden.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf Zoonoseerregern, die von Schweinen auf den Menschen übertragen werden können. Schweinefleisch ist besonders in den Industrienationen ein wesentlicher Bestandteil in Lebensmitteln tierischen Ursprungs und damit eine der Hauptquellen für Lebensmittel-assoziierte Infektionen bzw. Zoonosen. Schweine sind z.B. Träger von Bakterien wie *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp., welche die Hauptverursacher von Lebensmittelvergiftungen (gastrointestinale Infektionen) repräsentieren. Durch Verzehr von rohen bzw. unzureichend gegarten Schweinefleischprodukten können auch Parasiten wie Toxoplasmen oder Trichinen übertragen werden, wobei hier die Fallzahlen deutlich geringer sind.

Eine wichtige Rolle in dieser Arbeit spielt das Hepatitis E-Virus (HEV). Während Hepatitis A und B seit Jahrzehnten allgemein bekannte Infektionskrankheiten sind, gegen die bei Reisen in einige Drittweltländer standardmäßig eine Impfprophylaxe erfolgt, ist HEV ein deutlich weniger bekanntes Virus. Das Hepatitis E-Virus (HEV) ist ein einzelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus, das taxonomisch unter dem Genus *Hepevirus* in eine eigene Familie der *Hepeviridae* eingeordnet wird (Panda, 2007). Die Symptome entsprechen denen anderer Hepatitis-Infektionen, so dass der Erreger nur durch Strukturanalysen eindeutig identifiziert werden kann. Während HEV in vielen Ländern der Dritten Welt ein endemischer Auslöser humaner Epidemien über verunreinigtes Trinkwasser ist, traten in den Industrienationen lange Zeit nur sporadisch und in Zusammenhang mit Fernreisen Infektionsfälle auf (Purcell, 2008). Aufgrund steigender Fallzahlen, die in keinem Reisezusammenhang standen, kam in den letzten 20 Jahren immer häufiger die Frage auf, ob eine zoonotische Übertragung die Ursache für diese Erkrankungen darstellt. In einer Vielzahl an Studien wurde das Virus schließlich in verschiedenen Tierspezies nachgewiesen, wobei eine auffällige Sequenzhomologie humaner und porciner HEV-Isolate festgestellt werden konnte (Meng, 1997). Aufgrund der in anderen

Studien zeigten hohen Antikörperprävalenzen von Personen mit beruflichem Kontakt zu Schweinen bzw. Konsumenten von Wildschwein- und Schweineinnereien wird HEV daher mittlerweile als Zoonoseerreger mit Schweinen als Hauptreservoir angesehen, auch wenn die genauen Übertragungswege noch nicht komplett geklärt sind (Pavio, 2010). Die HEV-Infektion fällt somit unter die Definition der „neu aufkommenden Zoonosen“ (*emerging zoonoses*) und ist in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Um bessere Präventionsmaßnahmen ergreifen zu können, ist das Sammeln von mehr Informationen über die Prävalenz von HEV-Antikörpern in den Schweinebeständen ein wichtiges aktuelles Forschungsanliegen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung einer schnellen und parallelisierbaren Nachweismethode für Antikörper gegen verschiedene relevante Pathogene in Schweineseren. Die Forschungsarbeit wurde im Rahmen des Projektes „Innovatives Zoonosemonitoring bei Schlachtschweinen“ (AZ-963-11) der Bayerischen Forschungstiftung (BFS) durchgeführt. Hintergrund dieses Projektes ist die Erneuerung des Fleischhygienerechts im Rahmen des sogenannten EU-Hygienepaketes nach EG/854/2004. 2006 wurde die Möglichkeit einer risikoorientierten Fleischuntersuchung geschaffen, wonach bisher übliche Palpationen und Inzisionen bestimmter Gewebe und Organe nur noch im Verdachtsfall durchgeführt werden sollen, um Kosten aufgrund verkürzter Untersuchungszeiten einzusparen. Um eine solche Vorgehensweise zu ermöglichen, ist eine regelmäßige serologische oder mikrobiologische Kontrolle der Herdenbestände vorgesehen. Für eine gesamtheitliche Erfassung des Hygienestatus innerhalb der Schlachtroutine gerade auch in Bezug auf neu aufkommende Erreger mangelt es jedoch an geeigneten Methoden. Aktuell ist lediglich der Test auf Trichinen und Salmonellen vorgeschrieben, die Prävalenz anderer Erreger wurde bisher nur in Forschungsstudien untersucht. Daher existieren bisher nur wenige kostengünstige Nachweisverfahren für einzelne Erreger, so dass eine Multiplex-fähige Methode ein wichtiges Hilfsinstrument für die Überwachung und Minimierung des Eintrages von lebensmittelhygienisch relevanten Mikroorganismen, Viren und Parasiten darstellen würde.

Diese Aufgabenstellung sollte in Form eines Antigen-Mikroarray-Chips realisiert werden, der mit Hilfe der am Lehrstuhl für Analytische Chemie & Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC) der Technischen Universität München (TUM) entwickelten Mikroarray-Ausleseplattform MCR 3 (*Munich Chip Reader 3rd generation*) als

Chemilumineszenz-Durchfluss-Immunoassay ausgelesen werden kann. Die hierfür benötigten rekombinanten Antigene wurden im Rahmen des Förderprojektes von der Firma Mikrogen (Neuried) gestellt, die für die Erprobung des neuen Verfahrens nötigen Serumproben wurden vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) zur Verfügung gestellt.

Für die Entwicklungsarbeiten wurde hauptsächlich mit rekombinanten Antigenen des Hepatitis E-Virus gearbeitet, so dass die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse die generelle Eignung des Mikroarray-basierten Analysenverfahrens in Form einer Prinzipstudie am Beispiel des Nachweises von anti-HEV IgG aufzeigen sollen. Im späteren Verlauf des Projektes wurde der Chip für den parallelen Nachweis von anti-*Yersinia* IgG erweitert.

Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Nutzung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Rekombinante Antikörper sind als Fänger auf der Chipoberfläche immobilisiert und binden die in Serumproben enthaltenen Antikörper, welche gegen die Pathogene gebildet wurden. Der Nachweis der Bindungsreaktion erfolgt durch Zugabe von Enzym-markierten Detektionsantikörpern, welche den konstanten Teil der Zielantikörper erkennen. Mit Hilfe eines Substratgemischs wird ein Chemilumineszenz-Signal auf der Chipoberfläche generiert, welches von einer über dem Chip befindlichen CCD-Kamera detektiert und in Form von orts aufgelösten Bildern gespeichert wird.

Um einen schnellen und sensitiven Nachweis zu gewährleisten, mussten zunächst verschiedene Immobilisierungstechniken und Puffer für die rekombinanten Antigene getestet und optimiert sowie die Aktivität der Antigene überprüft werden.

Anschließend wurde die Chipoberfläche und die Assay-Gestaltung hinsichtlich Geschwindigkeit, Signalintensitäten und Matrixinterferenzen optimiert und die Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens mit Realproben untersucht.

Abschließend wurde das neu entwickelte Verfahren mit Hilfe von Titrationsreihen charakterisiert und mit bestehenden stationären Testverfahren verglichen, um Informationen über das Potenzial des Mikroarray-Assays in Form von Befundraten zu erhalten. Dazu musste ein Grenzwert für einen positiven Befund eingeführt werden und dieses Entscheidungskriterium anhand eines Seren-Panels mit den Befunden der zum Vergleich dienenden Assays überprüft werden.

2 THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Zoonotische Pathogene und ihre Risiken

Infektionskrankheiten stellen eine der häufigsten humanen Todesursachen dar. Nur wenige dieser Infektionskrankheiten betreffen ausschließlich den Menschen. Die meisten der humanen Krankheitserreger sind ebenfalls in Tieren existent oder weisen einen nicht-humanen Ursprung auf. Krankheiten, die auf natürlichem Weg wechselseitig zwischen Wirbeltieren und Menschen übertragen werden können, werden als Zoonosen bezeichnet (Christou, 2011). Dieser Begriff leitet sich aus dem Griechischen ab und setzt sich aus *zoon* (Lebewesen) und *nosos* (Krankheit) ab. Pathogene, welche humane Infektionen hervorrufen können, werden als Zoonoseerreger bezeichnet (2003/99/EG, 2003). Dazu gehören Bakterien, Viren, Parasiten, aber auch Pilze und Prionen. Aufgrund des unterschiedlichen Gefährdungspotenzials wird nach 2003/99/EG zwischen ständig überwachungspflichtigen (z.B. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Trichinella* spp.) und je nach epidemiologischer Situation überwachungspflichtigen (z.B. *Yersinia* spp., *Toxoplasma* spp., Hepatitis A Virus) Zoonoseerregern unterschieden.

2.1.1 Zoonotische Pathogene, ihre Verbreitung und ihre Überwachung

Von den ca. 1.400 aktuell bekannten, für den Menschen schädlichen Krankheitserregern besitzen fast zwei Drittel ein zoonotisches Potenzial und durch Mutationen kommen kontinuierlich neue Erregerstämme hinzu (Achilles, 2009; Christou, 2011). Beispiele für neu auftretende Zoonosen sind das schnell mutierende Vogelgrippe-Virus (Influenza A Virus) oder ein erst seit wenigen Jahren bekanntes Corona-Virus, welches das Schwere Akute Respiratorische Syndrom, kurz SARS, auslöst (Ksiazek, 2003; Webster, 2006). Schon lange bekannte klassische Zoonoseerreger sind dagegen Salmonellen oder Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli*-Bakterien (STEC), die als EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*)-Stämme in den Blickpunkt der Öffentlichkeit gelangt sind, als 2011 in Deutschland durch kontaminierte Bockshornkleesamen ein Häufung von Infektionen gemeldet wurde (BfR, 2011 a).

Die Behandlung von humanen zoonotischen Infektionskrankheiten ist mit enormen finanziellen Belastungen der Gesundheitssysteme verbunden. Daher beschäftigen sich alle weltweit relevanten Gesundheitsbehörden wie WHO (*World Health Organisation*), die amerikanische FDA (*US Food and Drug Administration*), die EU-Gremien und die nationalen Behörden mit Maßnahmen zur Aufklärung von Entstehung und Verbreitung zoonotischer

Erreger, um geeignete Maßnahmen zur Vermeidung, Kontrolle und Bekämpfung von Zoonosen treffen zu können. Auf europäischer Ebene fällt die Zuständigkeit für die Überwachung von Zoonosen nach der Richtlinie 2003/99/EG in den Aufgabenbereich der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) und des *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC). In Deutschland befassen sich vielerlei öffentliche Einrichtungen und Institute aus der Human- und Veterinärmedizin mit Projekten zum Thema Zoonosen und der Umsetzung der EU-Richtlinien. Eine wichtige Bedeutung kommt hierbei dem Friedrich-Löffler-Institut (FLI), dem Bundesinstitut für Risikoforschung (BfR) und dem Robert-Koch-Institut (RKI) zu. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMELV) fördert das Servicenetzwerk „Nationale Forschungsplattform für Zoonosen“ und erarbeitet den seit 2011 jährlichen Zoonose-Stichprobenplan nach der *AVV Zoonosen Lebensmittelkette*. Im Zeitalter der Globalisierung zählen die Vernetzung der nationalen und der länderübergreifenden Institutionen und der Aufbau einer gemeinsamen Datenbank zu den Hauptaufgaben, um gerade die Übertragungs- und Ausbreitungswege zoonotischer Erreger zu untersuchen und Pandemien zu verhindern.

Die Risikoquellen, die Verbreitung und insbesondere die Übertragungswege von Zoonoseerregern auf den Menschen sind vielfältig und komplex (siehe Abbildung 2.1).

Grundsätzlich wird zwischen einer Lebensmittel-assoziierten und einer Nicht-Lebensmittel-assoziierten Zoonose unterschieden.

Als Lebensmittel-assoziierte Zoonoseerreger (*foodborne zoonoses*) werden Pathogene bezeichnet, welche bei Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel oder Trinkwasser auf den Menschen übertragen werden. Hierzu zählen bakterielle Erreger wie *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., das Norovirus oder Parasiten wie Trichinen. Die Ausscheidung von Erregern über Fäkalien führt häufig zur Kontamination von Gewässern, die als Trinkwasserreservoirs dienen, was in der Folge eine Lebensmittel-assoziierte Zoonose auslösen kann.

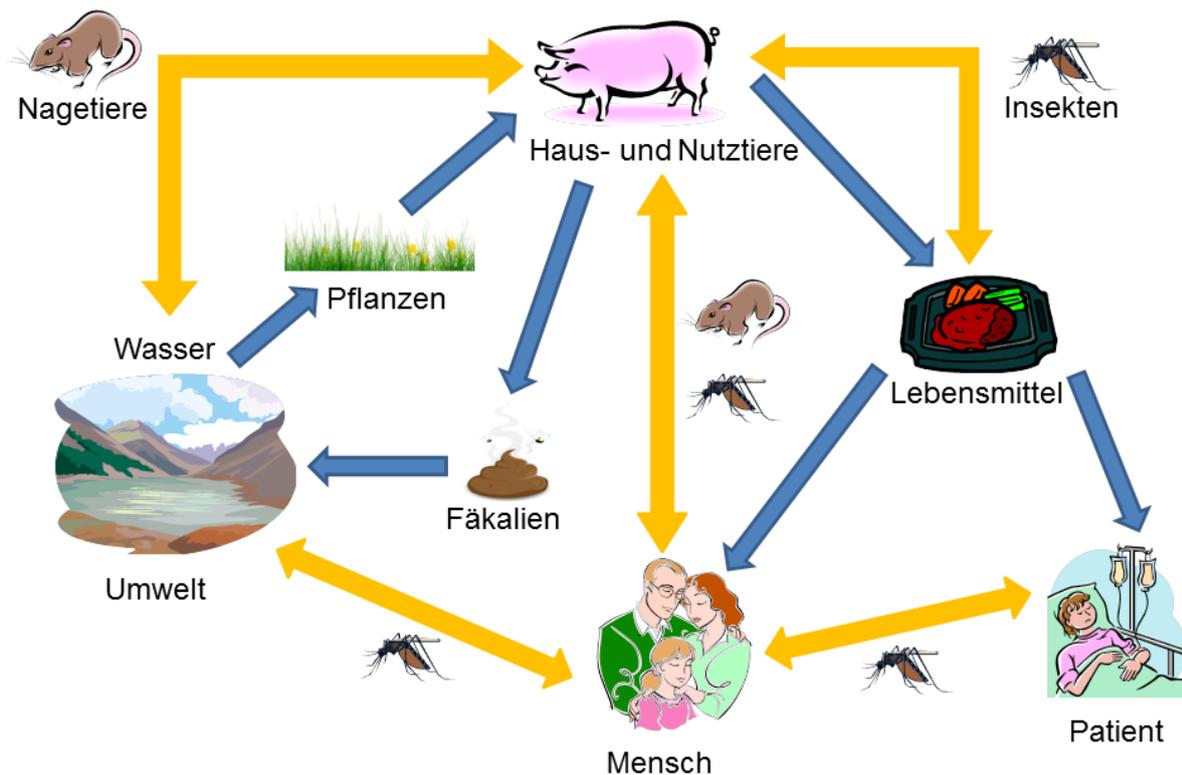


Abbildung 2.1: Vereinfachte Darstellung der Verbreitungs- und Übertragungswege von Zoonoseerregern.

Werden die pathogenen Erreger hauptsächlich durch den direkten Kontakt zwischen Mensch und Tier, z.B. bei Angestellten von Mastbetrieben, übertragen oder dienen Zwischenwirte wie Insekten, Vögel oder Nagetiere als Vektoren der Erreger, so spricht man von Nicht-Lebensmittel-assoziierten Zoonosen. Beispiele für solche Infektionskrankheiten sind die Vogelgrippe, ausgelöst durch das Influenza-A-Virus H5N1, oder das Q-Fieber. Neben der Nutztierhaltung kann auch die Haustierhaltung eine Quelle für humane Infektionen sein. Ein Problem bei der Erkennung von Zoonosen bei Tieren ist der dort häufig asymptomatische Verlauf der Infektion mit humanpathogenen Erregern.

Betrachtet man die Übertragungswege genauer, so lässt sich feststellen, dass bei Einhaltung von strengen Hygienevorschriften die Gefahr der Verbreitung effektiv minimiert werden kann (Macpherson, 2005). Beginnend mit dem Kreislauf bei der Nutztierhaltung, stellt gerade bei der heute üblichen Massentierhaltung der enge Kontakt der Tiere untereinander und die Bestandsdurchmischung durch Zukäufe fremder Tiere ein Risiko einer schnellen Verbreitung einer Infektion dar (Graham, 2008). Bei Milchvieh ist auch der indirekte Kontakt über verunreinigtes Melkgeschirr eine Hauptursache für Euterinfektionen und einer Kontamination der Rohmilch. Daher existieren Richtlinien und Vorschriften zum Hygienemanagement und

zum Monitoring von Tierseuchen in der Nutztierhaltung, die aufgrund der Problematik von vermehrt auftretenden Antibiotika-Resistenzen das Ausbrechen von Krankheiten in Ställen nach Möglichkeit verhindern sollen (AVV Zoonosen Lebensmittelkette, 2012, Tiergesundheitsgesetz, 2013). In der Schweinezucht sind z.B. Isolierställe vorgesehen, in denen neu einzustellende oder abzugebende Tiere gehalten und auf Krankheiten untersucht werden können, bevor sie mit dem vorhandenen Bestand in Kontakt kommen (Schweinehaltungshygieneverordnung, 1999). Das Personal und z.B. Veterinäre sind durch direkten Kontakt nicht nur einer Gefahr einer Übertragung vom Tier zum Menschen ausgesetzt, sondern können umgekehrt eine mögliche Eintragsquelle von Zoonoseerregern in den Betrieb darstellen. Dieser direkte Übertragungsweg ist eine relevante Verbreitungsquelle (Baker, 2009; Meng, 2002). Auch außerhalb von Masttier- oder Milchviehbetrieben können Zoonosen von Tieren auf Menschen übertragen werden, so zum Beispiel auf Zooangestellte oder Haustierbesitzer. Neben einem verantwortungsvollen Umgang zwischen Mensch und Tier sind somit die Reinigung und Desinfektion der Räumlichkeiten und Stallungen sowie die richtige Entsorgung der Fäkalien wichtige Vorkehrungen zur Prävention von Tierseuchen.

Sind Nutztiere mit einem humanpathogenen Erreger infiziert, so ist eine Kontamination von Lebensmitteln eine häufige Folge. Im Bereich der Fleischproduktion besteht hier besonders bei Verzehr von Produkten aus rohem Fleisch wie bestimmten Wurstwaren und Hackfleischprodukten eine Infektionsgefahr (Humphrey, 2007; Sofos, 2008). Nicht nur Produkte tierischen Ursprungs können mit zoonotischen Erregern verunreinigt sein, Produkte wie z.B. Gemüse können bei Düngung mit belasteten Fäkalien ebenfalls Zoonoseerreger tragen.

Neben dieser primären Kontamination von Lebensmitteln durch infizierte Tiere kann während des Schlachtprozesses und bei der Weiterverarbeitung von Fleischerzeugnissen eine sekundäre Kontamination stattfinden, sei es durch Kontakt der Schnittstellen mit anderen verunreinigten Lebensmitteln oder durch mangelnde Hygiene bei der Prozessierung, Verpackung und beim Transport. Auch hierfür wurden von der EU Verordnungen erlassen, welche die Hygiene und den Umgang mit Lebensmitteln tierischen Ursprungs regeln (Verordnungen (EG) 852/2004, 853/2004 und 854/2004).

Zuletzt können bei der Zubereitung von Speisen aus tierischen Produkten bzw. den Umgang mit potentiell verunreinigten Produkten Übertragungen bzw. Fremdkontaminationen stattfinden. Eine häufige Infektionsquelle ist der Verzehr von unzureichend gegarten Fleischprodukten oder unzureichend gewaschenem Gemüse oder Salaten. Einfache

persönliche Hygienemaßnahmen wie gründliches Händewaschen, eine getrennte Verwendung von Küchenutensilien und das Erhitzen der Speisen über 70 °C können hier das Risiko bakterieller Infektionen deutlich reduzieren (Redmond, 2003).

Neben der Einteilung der Infektionsquellen in Lebensmittel- und Nicht-Lebensmittel-assoziierte Zoonosen, ist Wasser eine wichtige Quelle für den Eintrag und die Verbreitung von Zoonoseerregern (Ewald, 1991). Geraten belastete Fäkalien über das Abwassersystem bzw. bei der Auswaschung aus Fäkalien bei der Düngung von Äckern und Feldern in den Wasserkreislauf, so kann auch Oberflächenwasser mit pathogenen Keimen verunreinigt werden. Wird im Zusammenhang von Zoonosen mit dem Risiko der Übertragung über das Wasser bzw. Trinkwasser gesprochen, so wird dies häufig unter dem Begriff *waterborne zoonoses* zusammengefasst. Diese Definition reicht von einer Infektion durch Kontakt mit Wasserlebewesen über die Aufnahme von pathogenen Keimen im Wasser bis hin zu einer Inhalation von Fäkalien-belastetem Aerosol und dem Einsatz belasteten Wassers bei der Lebensmittelprozessierung (WHO, 2004). In Ländern, in denen es an sanitären Einrichtungen mangelt, ist dabei der fäkal-orale Übertragungsweg eine häufige Ursache für den Ausbruch von Masseninfektionen (Ford, 1999).

Insgesamt sind die Kontrolle und Eindämmung von Zoonosen eine komplexe Herausforderung, die sich in Zukunft in Kombination mit Antibiotika-Resistenzen zu einem der wichtigsten Gesundheitsprobleme entwickeln kann. Neben dem vielfältigen Gebrauch des Wassers mit all seinen Risiken fördert z.B. die zunehmende Zahl an Menschen mit schwachem Immunsystem die Ausbreitung von pathogenen Erregern. Ein wichtiger Einflussfaktor ist auch der stetig steigende globale Personenverkehr, der zu einem Austausch von endemisch getrennten Erregerspezies führen kann. Gleichzeitig sind der Klimawandel und die in Folge immer häufiger auftretenden Naturkatastrophen in dicht besiedeltem Gebiet eine Risikoquelle für einen Ausbruch Wasser-assoziiertes Zoonosen. Um den Nahrungsbedarf einer schnell zunehmenden Weltbevölkerung zu decken, wird global gesehen in Zukunft eine weitere Intensivierung der Fleischproduktion in Massentierhaltung stattfinden, welche mit den komplexen Transport- und Prozessierungswegen eine Triebkraft für das Auftreten bekannter und unbekannter Zoonosen darstellt (WHO, 2004).

Die in diesem Kapitel allgemein aufgezeigten Probleme im Bereich der Lebensmittelproduktion hinsichtlich der Verbreitung von Zoonosen sind im Speziellen auch für die Schweinehaltung und die Verarbeitung bzw. den Konsum von Schweinefleischprodukten von Bedeutung. Auf die in diesem Zusammenhang relevanten Erreger wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1.2 Relevante Zoonosen in der Schweinefleischproduktion

2.1.2.1 Allgemeine Informationen zum Lebensmittel Schwein und seiner Kontrolle

Das Schwein inklusive seiner daraus hergestellten Produkte ist weltweit einer der wichtigsten Lebensmittellieferanten tierischen Ursprungs. Der hohe Schweinefleischkonsum (in Deutschland ca. 40 kg/Jahr und Person) in den westlichen Ländern führt zu einem großen Bedarf an Schweinen, die hauptsächlich in Zuchtanlagen mit hohen Tierpopulationen gehalten werden. Alleine in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union betrug 2010 der Bestand an Schweinen in der Ferkelzucht und der Masthaltung fast 145 Mio. Individuen (EFSA, 2012). Zu den größten Schweinefleischproduzenten zählt neben Frankreich, Polen, Spanien und den Niederlanden auch die Bundesrepublik Deutschland mit einem Totalbestand von ca. 27 Mio. Schweinen in ungefähr 33.000 Betrieben im Jahr 2010. Jährlich werden in Deutschland ca. 60 Mio. Tiere geschlachtet. Diese großen Zahlen sind mit der Notwendigkeit einer Haltung auf engem Raum verbunden, was vielerlei gesundheitliche Risiken für die Tiere birgt und eine schnelle Verbreitung von Infektionskrankheiten ermöglicht. Der Beitrag von kontaminiertem Schweinefleisch an lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen liegt bei ca. 10 % (EFSA, 2012).

Um belastetes Fleisch frühzeitig zu erkennen, wurde Anfang des 20. Jahrhunderts die obligatorische Fleischschau von Schlachttieren eingeführt, welche den Beginn des gesundheitlichen Verbraucherschutzes darstellt (BfR, 2008). Durch die konsequente Anwendung genormter Fleischuntersuchungsprozeduren konnten die damaligen sogenannten „klassischen“ Zoonosen wie Tuberkulose und Brucellose deutlich eingedämmt werden. Zusammen mit der Verbesserung der Haltungsbedingungen resultierte aus dieser Maßnahme ein deutlich besserer Gesundheitszustand der Schlachttiere. Allerdings wird diese pathologisch-anatomisch orientierte Fleischuntersuchung den aktuellen Gefahren für die menschliche Gesundheit nicht mehr gerecht, da häufig keine sichtbaren Veränderungen an Tierkörpern und Organen auf subklinisch verlaufende Zoonosen hinweisen (BfR, 2008; Fosse, 2008). Die Europäische Kommission hat im Rahmen des neuen EG-Lebensmittelhygienerechts auf diese Entwicklung reagiert und in der Verordnung EG/1244/2007 Änderungen der Bestimmungen für die festgelegten Kontrollen zur Fleischuntersuchung vorgelegt. Darin werden Regelungen zur Fleischkontrolle in Abhängigkeit des Risikoprofils getroffen. Dies erlaubt eine risikobasierte, rein visuelle Beurteilung des Fleisches, wenn dem zuständigen amtlichen Tierarzt bestimmte

Vorabinformationen zur Haltung und zum Gesundheitszustand der Schlachtschweine übermittelt werden. Diese Vorabinformationen müssen seit 2008 EU-weit vor der Anlieferung der Schlachtschweine auf dem Schlachthof durch den amtlichen Tierarzt bewertet werden. Auf Grundlage dieser Informationen wird entschieden, ob eine visuelle Fleischuntersuchung ausreicht oder eine traditionelle Fleischuntersuchung mit Abtasten und Anschnitt der Schlachttiere durchgeführt werden muss (BfR, 2008).

Die risikobasierte Untersuchung von Schlachtschweinen ist also nur dann möglich, wenn die Schlachttiere unter kontrollierten Bedingungen und in integrierten Produktionssystemen gehalten wurden. Unterstützend sollen nach EG/854/2004 serologische und/oder mikrobiologische Untersuchungen der Bestände auf relevante Zoonoseerreger zum Einsatz kommen, um ein effektives Monitoring zu gewährleisten. Momentan existieren allerdings nur für Trichinen und Salmonellen validierte Nachweismethoden, so dass ein dringender Bedarf an weiteren und optimalerweise Multiplex-fähigen Verfahren zur Detektion besteht.

Für die Umsetzung der serologischen Überwachung gibt es grundsätzlich zwei Varianten: Zum einen kann eine Gesundheitskontrolle am lebenden Tier in Form einer Blutentnahme durchgeführt werden, zum anderen kann die Probenahme auch während der Entblutung am Schlachtband stattfinden, wodurch weder dem lebenden Tier Stress zugefügt wird noch ein zusätzlicher personeller oder zeitlicher Mehraufwand entsteht. Da die Multiserologie kein Instrument zur Beurteilung eines einzelnen lebenden Individuums sein soll, sondern der Risikoabschätzung auf Bestandesebene dienen soll, ist die Probengewinnung während der Schlachthofroutine die Methode der Wahl und für die Salmonellen-Überwachung nach Verordnung 2160/2003/EG bereits gängige Praxis.

2.1.2.1 Das Schwein als Reservoir von Zoonoseerregern

Im Folgenden werden allgemeine Informationen zu den wichtigsten Zoonoseerregern, die in Schweinen nachgewiesen wurden, gegeben. Hierzu zählen bakterielle Erreger der Spezies *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Yersinia* spp. sowie Parasiten wie Toxoplasmen und Trichinen (Fosse, 2008). Die Zahlen und Daten zu den Infektions- und Prävalenzzahlen sowie die mikrobiologischen und epidemiologischen Informationen sind den im Literaturverzeichnis angegebenen EFSA- und BfR-Berichten für 2010 und 2011 entnommen. Das zoonotisch aktive Hepatitis E-Virus (HEV) wird gesondert beschrieben, da es im Rahmen dieser Doktorarbeit eine besondere Rolle spielt.

Salmonella enterica

Salmonella enterica gehört zur Gruppe der Enterobacteriaceae und ist ein gramnegativer stäbchenförmiger Erreger mit einer Größe von ca. 0,5 µm x 1,5 µm.

Die Spezies *S. enterica* wird weiter unterteilt in verschiedene Subspezies, wobei die Subspezies *S. enterica subspezies enterica* ein bedeutender Erreger von Lebensmittelbedingten Infektionen ist (McClelland, 2001). Aufgrund verschiedener Oberflächenstrukturen kann diese Subspezies in über 2.600 verschiedene Serovare unterteilt werden. Die wichtigsten Serovare, die häufig für Erkrankungen beim Menschen verantwortlich sind, sind hierbei die Serovare *S. enteritidis* (44 %) und *S. typhimurium* (25 %), die für den Großteil aller Salmonellosen verantwortlich sind.

Bei den verschiedenen Salmonella-Serovaren ist zu beachten, dass diese zum Teil sehr stark an bestimmte Wirte angepasst sind und nur bei diesem vorkommen. Andere Salmonellen wie *S. enteritidis* und *S. typhimurium* haben dagegen ein breites Wirtsspektrum und besitzen daher ein großes zoonotisches Potenzial. Das Auftreten einer Salmonellose im Nutztierbestand ist anzeigepflichtig.

Primäre Infektionsquellen für humane Erkrankungen sind vor allem Lebensmittel, die von Geflügel, Rind und Schwein stammen. Geflügel stellt dabei das Hauptreservoir dar, so dass der Verzehr von Hühnerfleisch und Eiern eine bedeutende Risikoquelle darstellt. In Mastschweinbeständen beträgt nach EFSA-Angaben die Prävalenz von *Salmonella* spp. EU-weit ca. 7 %, in Deutschland wurden im Jahr 2011 11,2 % der Proben aus Mastschweinbeständen positiv auf Salmonellen getestet. Die positiven Befunde in Schweinefleischprodukten liegen EU-weit im Bereich von 1 %, wobei bei Roh- und Hackfleischprodukten höhere Kontaminationen festgestellt wurden.

Die Inkubationszeit nach humaner Infektion kann bis zu drei Tagen betragen, in der Regel treten Symptome aber bereits nach 12 - 36 Stunden auf, auch in Abhängigkeit von der Menge der aufgenommenen Salmonellen. Eine Gastroenteritis mit Salmonellen beginnt meist spontan mit wässrigem Stuhlgang, der im weiteren Verlauf zunehmend Blutbeimengungen beinhalten kann. Zusätzlich treten abdominale Schmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen auf. Spätfolge einer Salmonellen-Infektion kann z.B. eine aseptische reaktive Arthritis sein. Salmonellen sind zusammen mit *Campylobacter* die wichtigsten Erreger von Gastroenteritiden. So wurden im Jahr 2011 europaweit fast 98.000 Fälle von humanen Salmonellosen gemeldet, davon rund 24.000 bestätigte Infektionen in Deutschland. Die

Infektionszahlen sind in den letzten Jahren leicht rückläufig, was auf einen ersten Erfolg der Maßnahmen speziell zur Salmonellen-Kontrolle und -Bekämpfung nach der Verordnung (EG) 2160/2003 hindeutet.

Campylobacter spp.

Campylobacter spp. sind gekrümmte gramnegative Erreger. Ihre Größe beträgt 0,2 - 0,9 µm x 0,5 - 5 µm. Wichtige Vertreter von thermotoleranten *Campylobacter* spp., die als Verursacher von Durchfällen beim Menschen eine Rolle spielen, sind *C. jejuni* und *C. coli*. Bereits die Aufnahme von ca. 1.000 Organismen von *C. jejuni* kann ausreichen, eine Erkrankung auszulösen (Humphrey, 2007). *Campylobacter* spp. kommen natürlicherweise bei verschiedenen Nutztieren und auch Haustieren vor. Diese Tiere stellen somit ein Reservoir für Lebensmittel-bedingte *Campylobacter*-Infektionen des Menschen dar.

Bei Tieren verlaufen *Campylobacteriosen* meist ohne Symptome. Wichtige Reservoir-Tiere sind u.a. Geflügel, Rinder, Schafe und Schweine (Oporto, 2007). In Studien wurde gezeigt, dass bis zu 85 % der Geflügelfleischprodukte mit *Campylobacter* spp. und 1 - 24 % der Schweinefleischprodukte kontaminiert sein können. *Campylobacter* spp. sind in Schweinebeständen weit verbreitet, werden aber auf Schlachttierkörpern und in Fleischproben nur selten nachgewiesen. Das Auftreten von *Campylobacteriose* bei Nutztier ist anzeigepflichtig.

Von der humanen meldepflichtigen *Campylobacteriose* sind besonders häufig Kinder unter sechs Jahren und Erwachsene im Alter von 20 - 40 Jahren betroffen. Die Erkrankungsdauer liegt in der Regel nach einer Inkubationsdauer von zwei bis fünf Tagen zwischen mehreren Tagen bis über eine Woche. Die Bedeutung von *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen zeigt sich allein schon durch die hohe und steigende Anzahl der verursachten Erkrankungen, die jedes Jahr gemeldet wird. So wurden im Jahr 2011 in Europa über 220.000 Fälle von *Campylobacter*-verursachten Magen-Darm-Infekten dokumentiert, was einer Häufigkeit von ca. 50 Fällen auf 100.000 EU-Bürger entspricht, und die damit fast doppelt so häufig auftreten wie Salmonellosen. Auch in Deutschland stellt die *Campylobacteriose* mit über 70.000 Infektionen die Hauptursache für Magen-Darm-Erkrankungen dar. In wenigen Fällen kann es neben Durchfall, Fieber und Übelkeit zusätzlich zu weiteren Komplikationen wie reaktiver Arthritis, der Infektion innerer Organe sowie dem Guillain-Barré-Syndrom kommen (Humphrey, 2007).

Yersinia enterocolitica

Der Genus *Yersinia* setzt sich aus drei Hauptspezies zusammen, die enteropathogenes Potenzial besitzen. *Yersinia enterocolitica* sind gramnegative Stäbchenbakterien mit einer Größe von ca. 0,2 - 0,9 µm x 0,5 - 5 µm. Weitere wichtige Säugetiererreger sind *Yersinia pseudotuberculosis* sowie *Yersinia pestis*, der Erreger der Pest.

Es werden verschiedene Biovare bei *Y. enterocolitica* unterschieden. Anhand ihrer Fähigkeit, bestimmte Stoffe zu verstoffwechseln, können die meisten pathogenen Stämme in die Biovare 1B, 2, 3, 4 und 5 eingeteilt werden (Bottone, 1999). Darüber hinaus werden *Y. enterocolitica* anhand unterschiedlicher Oberflächenstrukturen verschiedenen Serogruppen zugeordnet, wobei in Europa die Serogruppen O:1, O:2a, O:3, O:9, O:5,27 und O:27 die im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen am häufigsten vorkommenden Serogruppen sind. Wichtige Reservoirs für häufig beim Menschen vorkommende *Y. enterocolitica*-Stämme sind verschiedene lebensmittelliefernde Tiere, insbesondere Schweine (Bottone, 1997). Als Vektoren wurden vor allem kleine Nagetiere wie Ratten nachgewiesen (Backhans, 2011). Da bisher nur in Studien Prävalenzen für Yersinien in Nutztieren bestimmt wurden, ist die Datenlage zur Häufigkeit von *Y. enterocolitica* noch dünn. Untersuchungen in acht deutschen Bundesländern aus dem Jahr 2010 erbrachten eine durchschnittliche Durchseuchung von 12,2 % im Herdenbestand von Schweinen bei einer Einzelbefundrate von ca. 1,3 %. Dabei wurde hauptsächlich die Serogruppe O:3, welche zugleich die häufigste Serogruppe humaner Infektionen ist, nachgewiesen (Gurtler, 2005; Rosner, 2010). Damit ergibt sich das Risikopotenzial für den Konsumenten hauptsächlich aus Schweinefleischprodukten. Aufgrund der Fähigkeit des Bakteriums, auch bei Temperaturen unterhalb von 4 °C zu wachsen, können neben frischem Fleisch ebenso gekühlt gelagerte Fleischprodukte eine Infektion auslösen.

Als Folge einer Infektion mit *Y. enterocolitica* wurden 2011 in der EU insgesamt 7.011 Fälle von Yersiniosen, davon 3.397 Fälle in Deutschland, gemeldet, wobei hauptsächlich Kinder betroffen waren. Die Inkubationszeit beträgt ca. vier bis sieben Tage, die Symptome – hauptsächlich Durchfall, verbunden mit Fieber und abdominalen Schmerzen – können bis zu drei Wochen andauern. Neben den genannten Verlaufsformen kann es infolge einer Infektion mit *Y. enterocolitica* auch zu Autoimmunerkrankungen als zusätzliche Komplikation kommen (Baert, 1994).

Toxoplasma gondii

Toxoplasmen sind intrazelluläre Einzeller (Protozoen), die als Parasiten in der Katze ihre geschlechtliche Entwicklung vollziehen. Die von den Katzen (Endwirt) ausgeschiedenen Eier-ähnlichen Formen (Oozysten) entwickeln sich in der Außenwelt weiter und können dann Säugetiere und Vögel (Zwischenwirte) infizieren. Die Häufigkeit von *Toxoplasma gondii* in Schlachtschweinen in Deutschland wird auf ca. 1 % geschätzt.

Die meisten Infektionen des Menschen erfolgen entweder durch die Aufnahme von Oozysten oder den Verzehr von ungenügend erhitztem Fleisch infizierter Nutztiere (Tenter, 2000). Schätzungen gehen davon aus, dass 50 - 80 % der europäischen Bevölkerung den Parasiten bzw. Antikörper gegen ihn in sich tragen, der im Normalfall keine Symptome auslöst. Eine Toxoplasmose, ausgelöst durch *T. gondii*, kann jedoch im Falle einer Infektion während der Schwangerschaft (konnatale Infektion) zu Missbildungen beim Neugeborenen führen. 2011 wurden dem RKI 15 konnatale Toxoplasmose-Fälle aus acht Bundesländern gemeldet, wobei die Dunkelziffer deutlich höher eingeschätzt wird.

Trichinella spp.

Trichinen sind parasitäre Nematoden, die in einem breiten Spektrum an Wirtstieren, größtenteils Säugetieren, vorkommen und sich vollständig in einem Wirt entwickeln. Es existierten mehrere Spezies und Genotypen, wobei besonders *T. spiralis* humanpathogen wirkt. Nach den Ergebnissen der vorgeschriebenen Trichinenuntersuchung wird *Trichinella* beim Hausschwein in Deutschland nur noch sehr selten gefunden. In Ländern mit weniger kontrollierten Haltungsbedingungen wie Rumänien werden noch häufiger positive Proben gemeldet. Allerdings ist *Trichinella* in verschiedenen Wildtieren wie Fuchs und Wildschwein in Deutschland autochthon, so dass eine Übertragung des Parasiten von Wildtieren auf Nutztiere bei Freilandhaltung nicht ausgeschlossen werden kann und Wildtiere bzw. ihre Produkte auch eine Infektionsquelle für den Menschen darstellen können.

Im Jahr 2011 wurden in Europa 268 bestätigte Fälle einer humanen Trichinellose dokumentiert. Die Symptome einer akuten Trichinellose sind ähnlich zu denen der zuvor genannten Magen-Darm-Infekte und treten 8 - 15 Tage nach dem Verzehr kontaminierter Fleischprodukte auf.

2.1.3 Das Hepatitis E-Virus (HEV) und sein zoonotisches Potenzial

Während gerade die Salmonellose und die Campylobacteriose in Europa zu den bekanntesten Lebensmittel-assoziierten Infektionskrankheiten zählen, ist das Hepatitis E-Virus ein Infektionsauslöser, der meist nur als Trinkwasser-assoziiertes Auslöser von Hepatitis-Epidemien in Drittweltländern bekannt ist. Das zoonotische Potenzial von HEV ist jedoch seit gut 20 Jahren in der (veterinär)medizinischen Fachwelt ein Diskussionspunkt. Aufgrund der mittlerweile vorliegenden Studien kann aus wissenschaftlicher Sicht davon ausgegangen werden, dass Schweine als Überträger von HEV auf den Menschen eine wesentliche Rolle spielen, in offiziellen Verlautbarungen der Ministerien und EU-Gremien wird HEV bisher jedoch häufig noch als „in Zoonose-Verdacht stehendes“ Pathogen eingestuft. Dieses Kapitel ist daher auch dem aktuellen Stand der Wissenschaft in Bezug auf die Relevanz des HEV-Monitorings bei Mensch und Schwein zur Klärung der Verbreitungswege gewidmet.

Betrachtet man die Fallzahlen humaner HEV-Infektionen, die dem RKI übermittelt werden, so zeigt sich eine starke Zunahme an Infektionen in Deutschland in den letzten zehn Jahren von 17 bestätigten Fällen im Jahr 2002 bis hin zu 387 Fällen im Jahr 2012. Allein zwischen 2011 und 2012 hat sich dabei die Fallzahl fast verdoppelt (RKI, 2013). Zwar sind diese Infektionszahlen absolut gesehen gering, doch der Trend zeigt, dass HEV ein neu auftretender Infektionserreger ist, dessen Kontrolle ein Anliegen von Human- und Veterinärmedizin sein sollte.

2.1.3.1 Taxonomie und Struktur von HEV

Das Hepatitis E-Virus (HEV) wird erst seit Kurzem taxonomisch unter dem Genus *Hepevirus* in eine eigene Familie der *Hepeviridae* eingeordnet (Panda, 2007). Es handelt sich um ein einzelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus mit positiver Polarität. Zum ersten Mal wurde das Virus 1983 von Balayan identifiziert (Balayan, 1983). Der Durchmesser des Virions beträgt 27 - 34 nm. Unter dem Elektronenmikroskop zeigen sich sphärische Partikel, deren Oberflächenstrukturen denen der Caliciviren ähneln und welche gegenüber pH-Änderungen sehr stabil sind (Bradley, 1990). Die Kultivierung von HEV gestaltet sich schwierig, es existieren jedoch Studien, welche die Replikation des Virus in Nierenzellen von Affen bzw. humanen Leber- und Lungenkarzinomzellen nachwiesen (Huang 2000; Kazachkov, 1992; Tanaka, 2007).

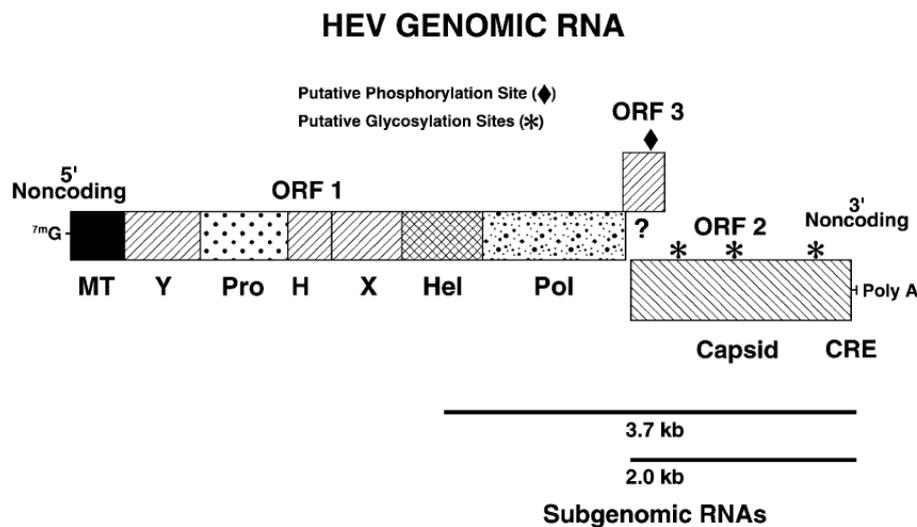


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des HEV-Genoms, bestehend aus drei ORF-Regionen. Abbildung aus (Purcell, 2008).

Nach heutigem Stand der Wissenschaft existiert nur ein HEV-Serotyp, man unterscheidet aber vier Genotypen, die als humanpathogen gelten (Schlauder, 1999).

Das Virusgenom enthält neben einem 3'-poly(A) Schwanz und kurzen 5' und 3'-nichtcodierenden Regionen drei offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs) und besitzt eine Gesamtgröße von ca. 7.200 Basenpaaren (Tam, 1991). Die Struktur des Genoms ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

ORF1 befindet sich in der Nähe des 5'-Endes und codiert für ein Polyprotein mit über 1.690 Aminosäuren, das möglicherweise posttranslational in multiple Nichtstrukturproteine gespalten wird, welche für die Virusreplikation benötigt werden. Dazu zählen eine Methyltransferase, eine Cysteinprotease, eine RNA-Helicase und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Panda, 2007). ORF2 befindet sich am 3'-Ende des Genoms und codiert für ein 72 kDa-großes Strukturprotein des Viruskapsids, welches aus 660 Aminosäuren besteht und eine Rolle bei der Gentranskription und der Ausbildung stabiler infektiöser HEV-Partikel spielt (Surjit, 2004; Parvez, 2011). Das exprimierte Protein bzw. Teile davon besitzen die größte Immunogenität, d.h. bei Infektion mit HEV bildet der Wirt hauptsächlich Antikörper, deren Paratop Proteinstrukturen der ORF2-Region erkennt (Zhou, 2004). Die Sequenz von ORF3 beginnt mit dem letzten Nukleotid von ORF1 und überlappt vollständig mit ORF2. Es ist das kürzeste der drei Leseraster und codiert für ein kleines, immunogenes, saures Phosphoprotein mit 123 Aminosäuren, das mit dem Cytoskelett des Virions assoziiert ist (Emerson, 2006; Zafrullah, 1997).

2.1.3.2 Epidemiologie und Reservoir von HEV

Das Hepatitis E-Virus ist ein Auslöser für epidemische und sporadische Hepatitis. Dabei sind die Symptome nicht von denen anderer Hepatitis-Viren abgrenzbar, so dass erst eine Strukturanalyse eine Zuordnung erlaubt. Allerdings unterscheidet sich die HEV-Infektion von einer Hepatitis A-Infektion durch eine längere Inkubationszeit (Purcell, 2008). Die Replikation von HEV findet im Zytoplasma von Leberzellen statt und das Virus wird in der akuten Phase in hohen Konzentrationen ausgeschieden. Die akuten Symptome einer HEV-Infektion sind Gelbsucht und Fieber. Im Regelfall verläuft die Infektion selbstlimitierend mit einer geringen Mortalitätsrate zwischen 0,1 % und 2 %. Während der Schwangerschaft steigt dagegen das Risiko eines fulminanten Verlaufes der Infektion, welcher ein akutes Leberversagen zur Folge haben kann (Teo, 2012). Eine Infektion schwangerer Frauen ist somit mit einer deutlich höheren Mortalitätsrate verbunden, die auf bis zu 20 % geschätzt wird (Purcell, 2008). In Deutschland ist HEV daher laut Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Seit dem Jahr 2001 werden die Hepatitis-E-Erkrankungen durch das RKI erfasst. Im Jahr 2012 wurden insgesamt 387 HEV-Infektionen gemeldet. Auffällig ist hierbei ein starker Anstieg an Fällen in den letzten Jahren, welcher sich in einer Verdreifachung der Fallzahlen seit 2009 ausdrückt (RKI, 2013)

Wie erwähnt sind vier humanpathogene HEV-Genotypen bekannt. Dabei sind die Genotypen 1 und 2 vor allem für Epidemien durch kontaminiertes Trinkwasser in endemischen Regionen verantwortlich, so dass HEV auch unter dem Beinamen der Wasser-assoziierten Hepatitis (*waterborne hepatitis*) bekannt ist (Panda, 2007). In Ländern mit mangelnden sanitären Einrichtungen oder fehlenden Kläranlagen ist die Hauptinfektionsquelle der fäkal-orale Weg. Ausbrüche von endemischen HEV-Epidemien wurden in verschiedenen Ländern Asiens, Nordafrikas und Mittelamerikas dokumentiert (siehe Abbildung 2.3). Große Epidemien fanden z.B. in der Kaschmir-Region 1978 - 1982 mit über 50.000 Infektionsfällen oder der indischen Provinz Kanpur 1991 mit fast 80.000 Fällen statt (Panda, 2007).

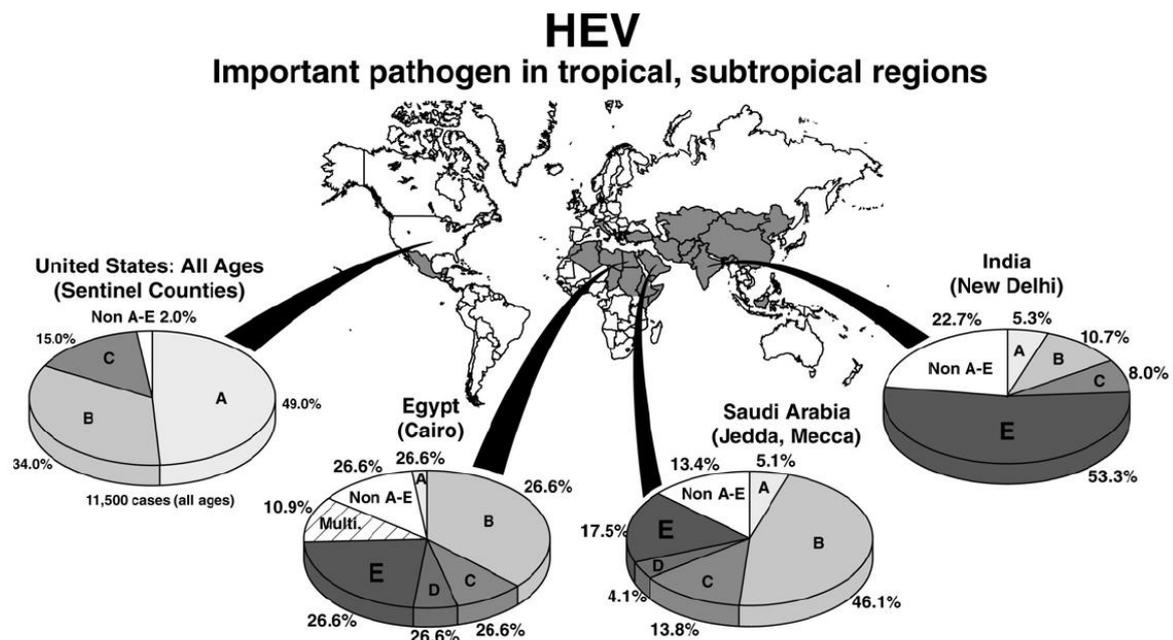


Abbildung 2.3: Geographische Verteilung von Hepatitis-Ausbrüchen in Abhängigkeit der verschiedenen Virushepatiden. Abbildung aus (Purcell, 2008).

In Indien stellt HEV-Genotyp 1 die häufigste Ursache von akuter Hepatitis dar, die je nach Epidemie bisher mit einer Mortalitätsrate zwischen 0,2 % und 4 % verbunden war (Panda, 2007).

In den Industrieländern wurden Infektionen mit den Genotypen 1 und 2 ausschließlich als reiseassoziierte Erkrankungen gemeldet. Dennoch werden auch in Europa und Nordamerika immer wieder sporadische Infektionen festgestellt, die in keinem Zusammenhang mit Auslandsreisen stehen. Bei der Untersuchung des Genoms konnte gezeigt werden, dass diese in Industrienationen beschriebenen autochthonen humanen Infektionen durch HEV der Genotypen 3 und 4 verursacht werden, wobei Genotyp 3 in Europa bei weitem überwiegt (Borgen, 2008; Ijaz, 2005; Mansuy, 2009). Die geographische Verteilung der sporadischen HEV-Infektionen in Bezug auf die gefundenen Genotypen ist Abbildung 2.4 gezeigt. Während in Europa, Nordamerika und Teilen Japans überwiegend der Genotyp 3 vorherrscht, dominiert Genotyp 4 in Südostasien. In Vorderasien und Nordafrika wird in Übereinstimmung mit den epidemischen Befunden auch bei sporadischen Infektionen überwiegend der Genotyp 1 identifiziert. Der Genotyp 2 wurde bei Patienten in Mexiko und Westafrika gefunden.

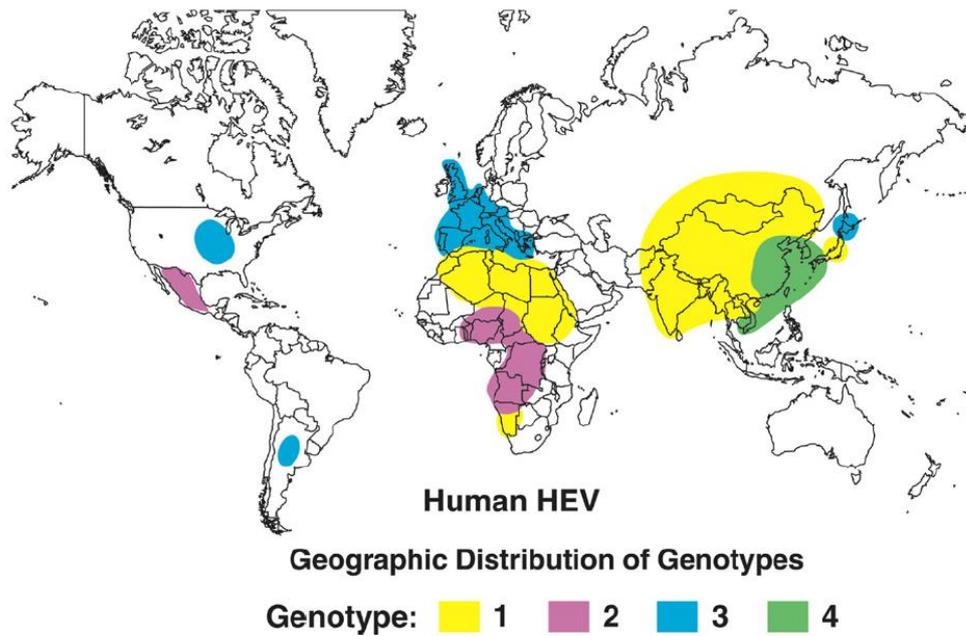


Abbildung 2.4: Geographische Verteilung der Genotypen humaner sporadischer HEV-Infektionen. Abbildung aus (Purcell, 2008).

Aufgrund der Häufung von autochthonen Infektionen in Europa, die durch keine fäkal-orale Übertragung über kontaminiertes Trinkwasser begründet sind, wurden Studien durchgeführt, die sich mit anderen Infektionsquellen beschäftigten. Neben einer Übertragung des Virus bei Bluttransfusionen und Organtransplantationen aufgrund von kontaminiertem Blut- bzw. Organspenden (Christensen, 2008; Vollmer, 2012) stand das evtl. vorhandene zoonotische Potenzial von HEV im Fokus der Untersuchungen.

Daher wurden verschiedene Tierspezies auf ihre HEV-Prävalenz bzw. ihre Seroprävalenz hinsichtlich HEV-Antikörper getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass verschiedene Säugetiere potentielle Reservoirs für HEV darstellen. Das Virus bzw. Antikörper dagegen wurden in Hausschweinen (Pavio, 2010; Rose, 2011; Rutjes, 2007; Wenzel, 2011), Wildschweinen (Adlhoch, 2009; de Deus, 2008; Tamada, 2004) und anderen Wildtieren wie Hirschen (Rutjes, 2010) sowie in deren Fleischprodukten gefunden (Bouwknegt, 2007; Feagins, 2007; Yazaki, 2003). Auch in Deutschland bestätigen aktuelle Studien eine hohe Seroprävalenz von HEV-RNA bzw. anti-HEV IgG in Schweineherden (Baechlein, 2010; Dremsek, 2013; Wacheck, 2012) und Wildschweinbeständen (Kaci, 2008). Je nach Studie liegt die Prävalenz für HEV-Antikörper in Schweineherden bei zum Teil deutlich über 50 %, bei Wildschweinen waren 17 - 42 % der getesteten Proben HEV-seropositiv, HEV-RNA wurde in 3 - 25 % der Proben

gefunden (Meng, 2011). Neben Schweinen wurde HEV in weiteren Nutztierarten wie Hühnern (Payne, 2009) und Kaninchen (Zhao, 2009) sowie in Ratten (Kabrane-Lazizi, 1999) als potentiellen Vektoren nachgewiesen.

Gerade für den Verzehr von Wildschweinfleisch und Schweineleber kann es als erwiesen gelten, dass eine Übertragung des Virus auf den Konsumenten möglich ist und HEV damit als Lebensmittel-assoziiertes Zoonoseerregers eingestuft werden muss (Meng, 2009; Tamada, 2004). Auch bei einem subklinischen Verlauf der Infektion lässt sich über den Nachweis von IgM- und IgG-Antikörper gegen HEV eine Reaktion des humanen Immunsystems auf das Virus feststellen (Masuda, 2004).

Im Unklaren bleiben bisher die genauen Übertragungsrouten des Virus von Tier zu Mensch. Im Gegensatz zum Menschen kann das Schwein anscheinend ausschließlich mit den Genotypen 3 und 4 infiziert werden, ein Nachweis von Genotyp 1 und 2 ist bisher nicht erfolgt (Teo, 2009). In Europa wurden hauptsächlich Isolate des Genotyps 3 nachgewiesen (siehe Abbildung 2.5). Diese Erkenntnis ist insoweit von großer Bedeutung, da die autochthonen humanen Krankheitsfälle in Europa ebenfalls auf den Genotyp 3 zurückgeführt werden können und damit ein Zusammenhang zwischen HEV bei Schwein und Mensch angenommen werden kann.

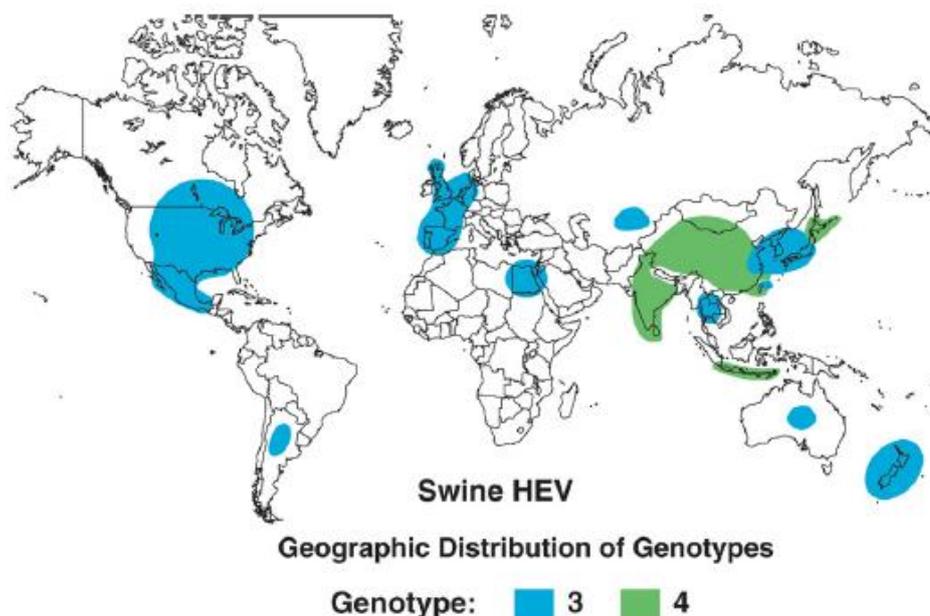


Abbildung 2.5: Geographische Verteilung der Genotypen porciner HEV-Infektionen. Abbildung aus (Purcell, 2008).

Genomanalysen bestätigen diesen Verdacht, da zwischen humanen und porcinen Isolaten eine sehr hohe Sequenzanalogie vorliegt (Lu, 2006; Meng, 1997). Bei humanen und porcinen Proben aus der gleichen Region konnten zum Teil höhere Übereinstimmungen festgestellt werden wie bei Proben von Schweinen aus verschiedenen Herkunftsgebieten. Gleichzeitig scheint der Genotyp 3 weniger infektiös zu sein als die Genotypen 1 und 2 (Purcell, 2008).

Während im Fall von Wildschweinfleisch das Risiko überschaubar ist, ist die Situation für Schweine in der Nutztierhaltung eine ganz andere. Als weltweit wichtige Nahrungsquelle stellt die Existenz von HEV in Schweinebeständen ein beachtliches Zoonosepotenzial dar. Dies gilt nicht nur für den Konsum von Fleischprodukten, sondern auch für den Kontakt zu Schweinen, wie er bei Angestellten von Zucht- und Mastbetrieben vorkommen kann. Neben der Ansteckung über kontaminierte Fäkalien konnte die Kontakt-Transmission des Virus unter Schweinen in Infektionsversuchen gezeigt werden, so dass die Übertragung auf andere Spezies wie den Menschen ebenfalls wahrscheinlich ist (Balayan, 1990; Bouwknecht, 2008; Meng, 1998). In diesem Zusammenhang spiegeln Prävalenzstudien unter Farm- und Schlachthofangestellten sowie Veterinären in verschiedenen Ländern dieses Gefahrenpotenzial wider, indem bei diesen Personengruppen gegenüber Kontrollgruppen erhöhte Antikörperprävalenzen nachgewiesen werden konnten (Christensen, 2008; Galiana, 2008; Krumbholz, 2012; Meng, 2002; Olsen, 2006). Allerdings wurden nicht nur bei HEV-exponierten Gruppen hohe Prävalenzen von bis zu ca. 30 % festgestellt, auch bei Personen, die nachweislich keinen Kontakt zu Schweinen hatten, konnte anti-HEV IgG nachgewiesen werden. So wurde von Faber *et al.* 2012 eine Studie mit über 4.000 erwachsenen Testpersonen aus allen deutschen Bundesländern durchgeführt, um soziodemographische Daten zur Seroprävalenz von HEV-Antikörpern in Deutschland zu erhalten (Faber, 2012). Es ergab sich eine durchschnittliche Prävalenz von 16,8 %. Dies indiziert, dass sowohl die Kontaktübertragung wie auch der Verzehr kontaminierter Lebensmittel eine Infektionsquelle darstellen und humane HEV-Infektionen mit subklinischem Verlauf keine Seltenheit sind. Damit ist HEV auch in den Industrieländern gerade aufgrund der noch nicht vollständig aufgeklärten Übertragungswege und Vektoren ein Zoonoseerreger, welcher weiterer Forschung und eines effektiven Monitorings insbesondere der Schweinebestände bedarf. Gerade die Übertragung des Virus aus der Umwelt auf Schweineherden in der Nutztierhaltung und weitere humane Infektionsquellen wie Trinkwasser sind Forschungsschwerpunkte, die zukünftig Wege für eine bessere Prävention und Bekämpfung dieser aufkommenden Zoonose aufzeigen sollen.

Ein weiteres Anliegen der Forschung ist die Suche nach effektiven Impfstoffen gegen HEV (Emerson, 2001; Shrestha, 2007; Tsarev, 1997; Worm, 2004), wie sie für Hepatitis A und B bereits seit längerer Zeit zur Verfügung stehen.

2.1.3.3 Nachweismethoden für HEV

Für den Nachweis von HEV bei Mensch und Tier bieten sich verschiedene diagnostische Methoden an. Während bei humanen Erkrankungen die Diagnostik bei Auftreten von Hepatitis-Symptomen beginnt, wird die Analytik und Diagnose von HEV bei Schweinen dadurch erschwert, dass dort die Infektion subklinisch verläuft, so dass keine äußeren Symptome auf eine Erkrankung hinweisen. Es müssen daher Stichproben genommen werden, um das Virus nachzuweisen. Ziel der aktuellen Forschung ist es jedoch ohnehin, über Prävalenzstudien die Übertragungswege und Verbreitung von HEV besser zu verstehen, so dass die Einzelfall-Diagnostik nicht im Mittelpunkt steht.

Der erste Nachweis von HEV-Partikeln erfolgte aus Stuhlproben mittels Immuno-Elektronenmikroskopie (IEM) (Balayan, 1983; Bradley, 1990). Hierzu wurden die Virus-Partikel durch Präzipitation mit Hilfe von Antikörpern, welche aus Seren akut infizierter Patienten gewonnen worden waren, aus der Probe abgetrennt und anhand ihrer physikalischen Eigenschaften von anderen Partikeln abgegrenzt. Dieser direkte Nachweis bedarf allerdings hoher Partikel- und Antikörper-Konzentrationen und ist mit einem hohen Kosten- und Arbeitsaufwand verbunden (Panda, 2007). Darüber hinaus können keine Informationen über den Genotyp gewonnen werden.

Versuche, eine effiziente Kultivierungsmethode von HEV für die Diagnostik zu etablieren, werden seit Jahren unternommen, doch bisher hat sich die Kultivierung für HEV nicht als Routine-Methode durchgesetzt (Okamoto, 2011).

Die in aktuellen Studien verwendeten Nachweismethoden basieren daher entweder auf dem Nachweis von Virus-RNA oder den vom Wirt produzierten Antikörpern gegen das Virus.

Der Nachweis der RNA erfolgt standardmäßig mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), im Speziellen der RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR). Als Probenmaterial dienen Stuhl- oder Serumproben (Chobe, 1997; Pina, 2000). Mithilfe dieser Methode kann ein sicherer Nachweis des Virus während der akuten Phase erfolgen und über die Sequenzanalyse ist eine Zuordnung zu Serotyp und Genomvariante möglich. Aufgrund der genetischen Diversität der HEV-Isolate ist die Sensitivität der RT-PCR von der

Übereinstimmung von Primer und Isolat abhängig (Okamoto, 2001). Es wurden daher Methoden entwickelt, die mittels universeller Oligonukleotid-Primer einen Nachweis eines breiten Spektrums an Isolaten zur Zielsetzung hatten (Erker, 1999). Für eine Analyse werden allerdings 7 - 9 Stunden benötigt. Darüber hinaus kann je nach Komplexität der Matrix auch eine Inhibition der PCR-Reaktion auftreten und zu falsch-negativen Befunden führen (Erker, 1999). Eine Voraussetzung für den PCR-Nachweis ist wie bei der Mikroskopie die Existenz des Erregers in der Probe. Bei der Aussagekraft von Prävalenzstudien auf PCR-Basis ist deshalb zu berücksichtigen, dass das Virus-Genom nach einer Infektion nur eine beschränkte Zeit im Stuhl nachweisbar ist (Mushahwar, 2008). Werden Proben vergleichend mit RT-PCR und Enzym-Immunoassays (EIA) auf anti-HEV IgM untersucht, so ist nur in den ersten zwei Wochen nach Infektion mit einer Übereinstimmung der Befunde zu rechnen (Panda, 2007). Zu späteren Zeitpunkten lässt sich häufig keine RNA mehr nachweisen, während IgG-Antikörper noch Monate bis Jahre nach der Infektion detektierbar sind (Clayson, 1995; Rutjes, 2010; Tsarev, 1993). Der früheste Zeitpunkt für die Nachweisbarkeit des Virus ist nach Experimenten von Bouwknecht *et al.* mit Schweinen im Mittel mittels PCR-Analytik sieben Tage nach der Infektion, anti-HEV IgG kann ca. zwei Wochen später, d.h. ca. drei Wochen nach der Inokulation, in Serumproben detektiert werden (Bouwknecht, 2009; Halbur, 2001).

Die längere Nachweisbarkeit und die Möglichkeit, zwischen akuten (Bildung von IgM-Antikörpern) und vergangenen (Bildung von IgG-Antikörpern) Infektionen unterscheiden zu können, sind Vorteile, die den indirekten immunologischen Nachweis von HEV für Studien zur Pathogenese und Prävalenz von HEV attraktiv macht (Bendall, 2008). Seit den frühen 1990er Jahren wurden in Forschungsarbeiten verschiedene ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Methoden entwickelt, die einen Nachweis von IgM- und/oder IgG-Antikörpern in tierischen oder humanen Seren ermöglichen. Diese Assays basieren auf rekombinanten Antigenen, die durch Expression der ORF-Regionen des HEV-Genoms hergestellt werden (Dawson, 1992; Tsarev, 1993). Dabei erwiesen sich bei humanen Proben Antigene auf Basis von ORF2 als diejenigen mit der größten Immunogenität und es wurden neben Proteinen auf Basis der Gesamtsequenz auch Proteine einer verkürzten Sequenz (*truncated sequence*) exprimiert und getestet (Robinson, 1998; Zhou, 2005). Mittlerweile sind die Protokolle der Expression und Aufreinigung soweit standardisiert, dass auch kommerzielle validierte ELISA-Kits für den Nachweis von anti-HEV-IgG/IgM zur Verfügung stehen und in Prävalenzstudien weltweit zum Einsatz kommen. Für humanes

Probenmaterial können klassische Mikrotiterplatten-Assays z.B. von den Anbietern Axiom Diagnostic (Worms), Fortress Diagnostics (Antrim, UK), Mikrogen Diagnostik (Neuried) und MP Biomedicals (Singapur) bezogen werden. Diese Tests sind schneller und einfacher in der Abarbeitung als die PCR-Analytik. Darüber hinaus steht mit dem *Line Immunoassay* (LIA)-Kit der Fa. Mikrogen (*recomLine HEV IgG/IgM*) ein Teststreifen-Format zur Verfügung, mit welchem die Seroreaktivitäten verschiedener rekombinanter Antigene auf Basis der Genotypen 1 und 3 parallel mit Proben untersucht werden können. Dieser Test ist für humane Serumproben validiert, wird jedoch mittlerweile häufig als Referenz für *In-house-ELISA*-Studien mit Schweineseren verwendet. Nachdem Schweine als Hauptreservoir für zoonotisch bedingte humane HEV-Infektionen identifiziert worden waren, wurden auch ELISA-Tests für die Untersuchung von Schweineseren auf HEV-Antikörper adaptiert (Meng, 1999; Wacheck, 2012). Aus dem von Wacheck *et al.* in Kooperation mit Mikrogen entwickelten ELISA ging ein mittlerweile kommerziell erhältliches ELISA-Kit hervor, das von Prionics (Schlieren-Zürich, Schweiz) unter dem Handelsnamen Priocheck® HEV porcine vertrieben wird. Problematisch bei der Bestimmung von Prävalenzraten mittels Antikörpernachweis ist, dass die Hersteller unterschiedliche Sequenzen und Genotypen für die Herstellung der rekombinanten Antigene verwenden und für die Beschichtung der Platten zum Teil Antigen-Mischungen aufgetragen werden, so dass in Vergleichstests unterschiedliche Sensitivitäten und damit auch Befundraten erzielt wurden (Baechlein, 2010; Dremsek, 2013; Drobeniuc, 2010; Wacheck, 2012). Daher ist eine weitere Standardisierung der Methoden durch Verwendung homologer Antigene notwendig.

2.2 Immunoassays als Analysenmethode

Neben physikalisch-chemischen Trennverfahren mit spektroskopischer Detektion werden in der Lebensmittelchemie häufig auch immunologische Verfahren zur Rückstandsanalytik verwendet. Die Basis der Immunoanalytik bilden Antikörper, welche eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung mit einem Antigen bzw. Analyten eingehen können. Die Verbreitung von Immunoassays im Laboralltag liegt zum einen in der relativ einfachen Durchführung der Assays, zum anderen in der Fähigkeit von Antikörpern, die gesuchte Substanz aus einer Vielzahl unterschiedlicher Stoffe aufgrund spezifischer molekularer Erkennungsstrukturen nachweisen zu können.

2.2.1 Klassen und Eigenschaften von Antikörpern

Zur Abwehr körperfremder Substanzen stehen dem Wirbeltierorganismus zwei Systeme zur Verfügung: Das angeborene unspezifische Immunsystem und das adaptive spezifische Immunsystem. Die unspezifischen Abwehrmechanismen richten sich gegen weit verbreitete Oberflächenstrukturen von fremden Stoffen, zum größten Teil Bakterien. Zu dieser Abwehr gehören die Phagozyten, die sich aus Makrophagen und Granulozyten zusammensetzen. Die Phagozyten stehen dem Organismus immer zur Verfügung und lösen bei Eindringen eines Fremdkörpers eine Reaktion des adaptiven Immunsystems aus. Die adaptive Immunabwehr führt zur Bildung von Immunzellen, den B- und T-Lymphozyten, und schließlich nach deren Aktivierung über komplexe Differenzierungswege via Gedächtniszellen zur Produktion von spezifischen Antikörpern. Jede B-Zelle produziert dabei einen eigenen Antikörperklon, was aufgrund der mehreren vorliegenden Epitope des zu bindenden Antigens zu einem Gemisch verschiedener Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten führt (polyklonale Antikörper). Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Glykoproteine, welche je nach Struktur, Molekulargewicht und Anzahl der Bindungsstellen in verschiedene Antikörperklassen eingeteilt werden können. Diese zirkulieren frei im Blut und extrazellulären Flüssigkeiten, sind aber zum Teil auch fest an den Oberflächen von B-Lymphozyten gebunden. Antikörper binden ihr jeweiliges Antigen und lösen eine Signalkette zur Eliminierung des erkannten Fremdkörpers aus (Raem, 2007). Jedes Wirbeltier kann ca. 10^8 verschiedene Antikörpermoleküle bilden.

Von den B-Lymphozyten werden fünf Immunglobulinklassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) produziert, von denen mengenmäßig die Immunglobuline des Isotyps G (IgG) am bedeutsamsten sind. Alle Antikörper besitzen eine gemeinsame Grundstruktur, die am Beispiel von IgG in Abbildung 2.6 schematisch gezeigt wird.

Das IgG-Molekül ist ein Dimer, welches aus je zwei identischen schweren (C_H , je ca. 55 kDa) und zwei identischen leichten (C_L , je ca. 25 kDa) Ketten besteht und ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa besitzt. Es ergibt sich ein spiegelsymmetrisches Y-förmiges Molekül, dessen Arme zwei Antigen-bindende variable Bereiche (F_v), die sogenannten Paratope, darstellen, während der Stamm des Moleküls die konstante Region (F_c) bildet.

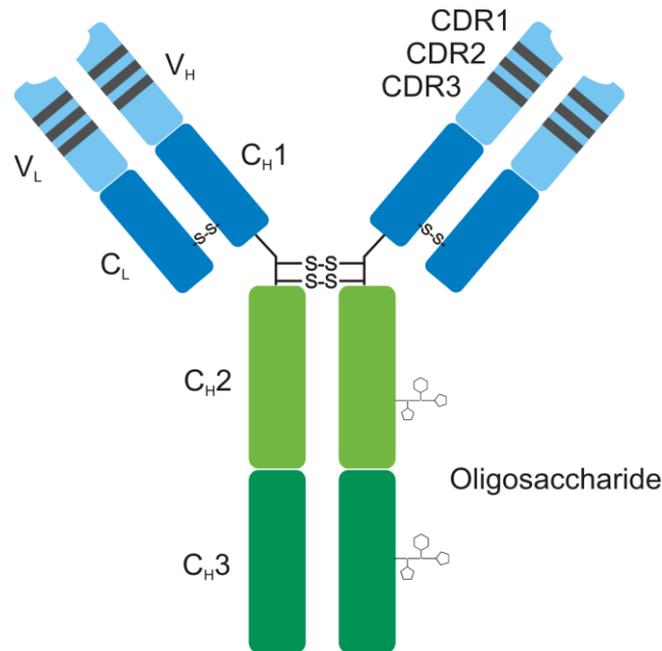


Abbildung 2.6: Schematische Struktur eines IgG-Antikörpers, aufgebaut aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die Antigen-Bindungsstellen befinden sich zwischen den variablen Teilen der schweren und der leichten Ketten (V_H, V_L).

Sowohl die beiden schweren Ketten als auch jeweils eine leichte und eine schwere Kette sind über nicht-kovalente Bindungen und reduktionsempfindliche Disulfidbrücken verbunden. Die Verbindung der beiden schweren Ketten liegt in der sogenannten *Hinge*-Region, die eine Scharnierfunktion erfüllt, so dass sich das Molekül der Antigenstruktur anpassen kann.

Der Unterschied in der Spezifität und damit die Diversität der Antikörper ergibt sich aus Strukturänderungen in den hypervariablen Bereichen V_H und V_L der beiden Paratope eines IgGs, die auch als CDRs (*complementary determining regions*) bezeichnet werden (Chothia, 1985). Die beiden Paratope nutzt die Natur ähnlich dem Chelateffekt in der Koordinationschemie für eine Bindungsverstärkung aus, die als multivalenter Effekt (Avidität) für die Immunoanalytik große Bedeutung besitzt.

Die Bindung von Antigen und Antikörper erfolgt über Ausbildung von elektrostatischen Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie van-der-Waals- und hydrophoben Wechselwirkungen (Raem, 2007). Aus der Summe dieser nichtkovalenten Bindungen ergibt sich insgesamt eine große Bindungsstärke, die zu einer geringen Dissoziation des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes führt. Diese Bindungsstärke hängt von den sterischen Bedingungen der Bindungstasche des Antikörpers (Paratop) und der Erkennungsstruktur des Antigens (Epitop) ab und kommt erst bei Annäherung beider Regionen zustande. Bezogen auf

den Antikörper wird eine gute Passform der variablen Region als hohe Affinität bezeichnet. Die Affinitätskonstanten K_D von IgG-Antikörpern liegen in einem Bereich von 10^{-3} - 10^{-9} M (Berg, 2007).

Neben den IgG-Antikörpern, die ca. 75 - 85 % der Serumantikörper ausmachen, sind die IgM-Antikörper von Bedeutung (Raem, 2007). Diese sind zwar in deutlich geringeren Konzentrationen im Blut und extrazellulären Flüssigkeiten vorhanden, spielen aber bei der primären adaptiven Immunantwort die entscheidende Rolle. Daher werden bei akuten Infektionen zunächst IgM-Antikörper nachgewiesen, während IgG-Antikörper erst im späteren Verlauf gebildet werden. IgM-Antikörper sind Pentamere und können somit mehrere Epitope gleichzeitig binden, d.h. sie besitzen eine sehr hohe Avidität.

Die Bildung von Antikörpern gegen körperfremde Substanzen durch das Immunsystem von Wirbeltieren wurde bereits im späten 18. Jahrhundert für erste Impf-Experimente ausgenutzt (Raem, 2007). Durch Zugabe von kleinen Dosen an Krankheitserregern wurde eine Infektion ausgelöst, welche die Bildung von Antikörpern induzierte und damit für spätere Infektionen einen Impfschutz gewährte.

Heutzutage wird eine Vielzahl von Antikörpern kommerziell produziert, um in der Rückstandsanalytik eine Vielzahl verschiedener Zielsubstanzen aus verschiedensten Matrices und mittels verschiedenster Assay-Varianten nachzuweisen.

Die Gewinnung und Anwendung von Antikörpern wurden seit ihren Ursprüngen bis in die heutige Zeit deutlich weiterentwickelt. Die anfänglich aus Tieren gewonnenen Antikörper eigneten sich nur für vereinzelte Anwendungen in Forschung und Medizin und konnten nur in geringen Mengen bereitgestellt werden. Erst die Forschungsergebnisse der Nobelpreisträger Georges J. F. Köhler und César Milstein im Jahr 1975 legten den Grundstein für wesentlich spezifischere Anwendungen und führten zu einer enormen Ausweitung der Nutzung von Antikörpern in Wissenschaft und Medizin (Köhler, 1975). Die durch Köhler und Milstein etablierte sogenannte *Hybridoma*-Technik, bei der Blutkrebszellen mit Antikörperproduzierenden B-Zellen vorwiegend aus Mäusen oder Ratten verschmolzen werden, erlaubte eine Produktion spezifischer Antikörper in großen Mengen. Dadurch wurde erstmalig die kontinuierliche Herstellung eines definierten monoklonalen Antikörpers möglich, der genau ein charakterisiertes Zielmolekül erkannte. Bis zu diesem Zeitpunkt war nur die Herstellung eines polyklonalen Gemischs verschiedener Antikörper möglich gewesen.

In der modernen kommerziellen Antikörperproduktion werden immer häufiger auch biotechnologische Herstellungsmethoden eingesetzt. Mithilfe rekombinanter

Produktionsmethoden können Antikörper in Bakterienzellen produziert werden, die genau auf den späteren Verwendungszweck und die benötigte Menge eines Antikörpers zugeschnitten sind (Little, 2000). Die Vorteile der Herstellung von Antikörpern in Bakterien wie *E. coli* liegen hauptsächlich in der vergleichsweise einfachen und sicheren Handhabung der Bakterienzellen und in den schnellen Produktionszyklen der Mikroorganismen.

2.2.2 Immunologische Methoden und Formate

Die Basis aller immunologischen Methoden ist die Antigen-Antikörper-Bindung. Diese kann dazu genutzt werden, unbekannte Analyten bzw. Zielanalyten mit Hilfe spezifischer Rezeptoren aus komplexen Matrices abzutrennen und nachfolgend zu detektieren.

Die Detektion erfolgt in der Regel über die Markierung von Antigenen oder Antikörpern. Historisch gesehen wurden zunächst radioaktive Isotope wie Iod-125 in Radioimmunoassays (RIA) eingesetzt (Lequin, 2005; Skelley, 1973). Am gebräuchlichsten sind aktuell neben Fluoreszenzimmunoassays (FIA) Enzym-Immunoassays (EIA), bei denen die erfolgte Bindungsreaktion über den Enzym-katalysierten Umsatz entweder eines Farb- (chromogener ELISA) oder eines Chemilumineszenzsubstrates (CL-ELISA) nachgewiesen wird. Zu den am häufigsten verwendeten Markerenzymen zählen die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), die β -Galactosidase und die alkalische Phosphatase (AP) (Butler, 2000). Der Vorteil von Enzymen zu Detektionszwecken liegt in ihrer zeitabhängigen Signalverstärkung durch den Substratumsatz.

Je nach Anwendungszweck und -voraussetzungen werden nicht nur verschiedene Detektionsmethoden eingesetzt, es kommen auch unterschiedliche ELISA-Formate zur Anwendung. Allen Immunoassays gemeinsam ist die Beteiligung von Fänger-, Analyt- und Detektormolekülen zur Erzeugung eines auslesbaren Signals.

In Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methodik muss darauf hingewiesen werden, dass die meisten klassischen Formate darauf abzielen, Antigen-Zielstrukturen mit Hilfe von durch Immunisierung gewonnenen Antikörpern nachzuweisen, während im Fall des indirekten Zoonosen-Nachweises die nach einer Immunreaktion gebildeten Antikörper selbst das analytische Ziel (*target*) darstellen und die Spezifität des Nachweises über geeignete Antigenstrukturen der Pathogene erzeugt wird.

Grundsätzlich kann bei Enzymimmunoassays zwischen heterogenen und homogenen Verfahren unterschieden werden. Ein homogener ELISA findet in der flüssigen Phase statt, ein heterogener Assay dagegen an einer Festphase, an der die Antigene oder die Antikörper immobilisiert werden. Homogene Assays werden z.B. in Form von Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA) verwendet (Smith, 2008). Bei homogenen Assays entfällt der Beschichtungsprozess und sie lassen sich somit schnell durchführen, da alle Bindungsreaktionen in Lösung erfolgen. Für komplexe Matrices sind solche homogenen Assays jedoch nur bedingt tauglich, da keine Waschschriffe durchgeführt werden, welche Matrix-Interferenzen reduzieren.

Bei heterogenen Assays ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal, ob Antigen oder Antikörper an der Festphase gebunden ist. Wird ein Antikörper, der sogenannte Fängerantikörper (*capture antibody*), an der Oberfläche immobilisiert, so wird von einem direkten Format gesprochen, befindet sich dagegen das Antigen auf der Festphase, so liegt ein indirektes Format vor (Butler, 2000)

Darüber hinaus werden enzymimmunologische Verfahren in kompetitive und nichtkompetitive Systeme eingeteilt (siehe Abb. 2.7).

Bei einem kompetitiven Assay handelt es sich um ein ELISA-Format, bei dem eine Konkurrenzreaktion für die Signalerzeugung ausgenutzt wird. Bei indirekten kompetitiven Assays konkurrieren die in der Probenlösung befindlichen Analyten mit den Festphasengebundenen Derivaten um die verfügbaren Bindungsstellen der mit der Probe zugegebenen spezifischen Antikörper (A). Dieses Prinzip ist das gängigste Format für den Nachweis niedermolekularer Strukturen wie z.B. Antibiotika oder Mykotoxine. Bei einem direkten kompetitiven Immunoassay werden der Probe statt Antikörpern markierte Zielmoleküle zugegeben, so dass es zu einer Konkurrenz der markierten Moleküle und der nicht markierten Analyte um die Bindungsstellen der immobilisierten Antikörper kommt (B). Das bekannteste ELISA-Format ist das nichtkompetitive, direkte *Sandwich*-Format (C). Hier wird das Zielmolekül über den Antigen-Antikörper-Komplex am Fängerantikörper gebunden und über einen zweiten Antikörper, den Detektionsantikörper, nachgewiesen. Der Analyt befindet sich also zwischen zwei Antikörpern eingebettet, was diesem Format seinen Namen verleiht. Voraussetzung für dieses Format ist, dass die Zielstruktur über zwei räumlich getrennte Epitope verfügt, was eine gewisse Molekülgröße bedingt und daher bei der Detektion von pathogenen Erregern, Proteinen und anderen Makromolekülen zum Einsatz kommt.

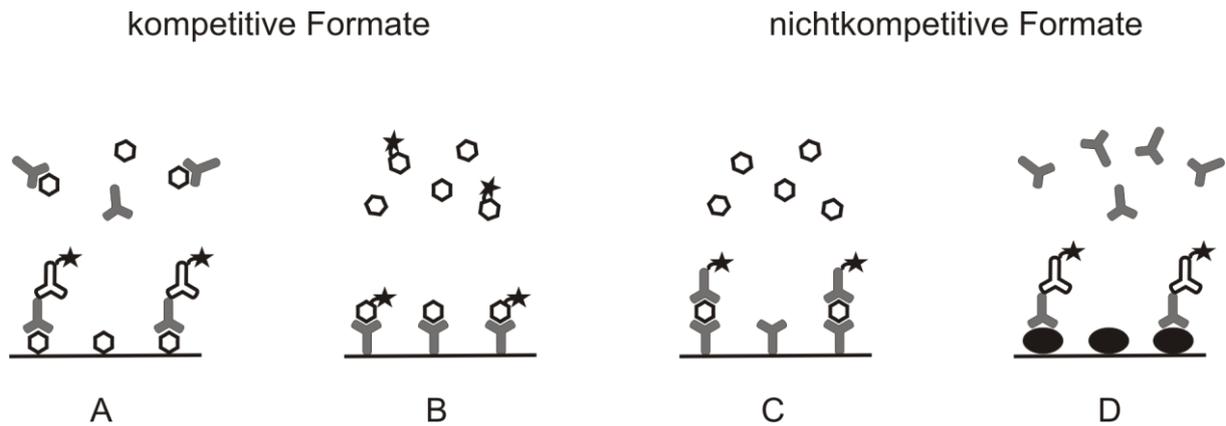


Abbildung 2.7: Schematischer Ablauf verschiedener ELISA-Formate: A) indirekter kompetitiver Immunoassay, B) direkter kompetitiver Immunoassay, C) direkter nichtkompetitiver Immunoassay (*Sandwich*), D) indirekter nichtkompetitiver Immunoassay.

Das in der Arbeit verwendete Assay-Prinzip folgt ebenfalls einem nichtkompetitiven Format, allerdings dient hier nicht ein spezifischer Antikörper als Rezeptor an der Oberfläche, sondern ein spezifisches Antigen, an welches der Zielantikörper mittels seiner Paratope bindet (D). Die Detektion erfolgt dann mit Hilfe eines markierten Detektionsantikörpers, welcher die F_c -Region des Zielantikörpers erkennt. Da sich hier das Zielmolekül bei der Detektion zwischen Fänger- und Detektormolekül befindet, wird dieser Assay auch als indirekter *Sandwich*-Immunoassay bezeichnet. Eine weitere Variante zum Nachweis von Antikörpern ist ein *Sandwich*-Aufbau, bei dem der Zielantikörper nicht mit Hilfe eines F_c -spezifischen Detektionsantikörpers markiert wird, sondern durch ein zweites Antigen, welches Enzym-markiert ist. Ein solcher *Doppel-Antigen-Sandwich*-Immunoassay wird z.B. bei dem HEV-Antikörper-Nachweis der Fa. Axiom eingesetzt. Im Unterschied zur Verwendung eines Detektionsantikörpers werden bei diesem Testaufbau HEV-Antikörper aller Ig-Klassen und auch Spezies-übergreifend erkannt, was je nach Anwendungszweck seine Vor- und Nachteile hat.

Bei der Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung kann zwischen einer direkten und einer indirekten Signalerzeugung unterschieden werden. In diesem Zusammenhang bedeutet direkt, dass der Detektionsantikörper markiert ist wie in Abbildung 2.7 C, während als indirekter Assay eine Markierung über z.B. einen zweiten Antikörper wie in 2.7 A bezeichnet wird. Der Vorteil der indirekten Detektion mit Hilfe eines markierten Sekundärantikörpers begründet sich vor allem darin, dass dieser eine Spezifität gegenüber dem F_c -Teil des primären Antikörpers besitzt und damit unabhängig von der nachzuweisenden Substanz in einer

Vielzahl verschiedener Assays basierend auf spezifischen Antikörpern derselben Antikörperklasse eingesetzt werden kann (Nielsen, 2004). Gleichzeitig lässt sich durch Verwendung eines zweiten Antikörpers oft eine Signalverstärkung und aufgrund des zusätzlichen Waschschrilles ein höheres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR) erzielen. Statt der Verwendung eines markierten Sekundärantikörpers, welcher an den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet, kann der Primärantikörper am F_c-Teil biotinyliert und ein Streptavidin-HRP-Konjugat zu Signalgenerierung zugegeben werden (Nielsen, 2004). Durch Mehrfach-Biotinylierung kann so eine Signalamplifikation erreicht werden.

Für die Signalerzeugung und -detektion ist von Bedeutung, ob ein kompetitiver oder nichtkompetitiver Assay durchgeführt wird. Bei einem nichtkompetitiven Assay befindet sich lediglich das Zielmolekül in der Probe, d.h. je höher die Analyt-Konzentration, desto mehr Antigen-Antikörper-Komplexe werden gebildet und desto höher auch das erzeugte Signal. Liegt hingegen eine Konkurrenz vor, so sinkt mit steigender Analyt-Konzentration das generierte Signal. Bei einem direkten kompetitiven Assay binden mit höherer Analyt-Konzentration hauptsächlich die Analytmoleküle aus der Probe am Antikörper, während ein Großteil der markierten Analytderivate bei Waschschrillen entfernt wird, so dass nur ein geringes Signal resultiert. Bei einem indirekten kompetitiven Assay wird durch hohe Analyt-Konzentrationen ein Großteil der zugegebenen Primärantikörper bereits in Lösung mit Analytmolekülen belegt, so dass nur wenige Primärantikörper an der Oberfläche binden können und im nachfolgenden Schritt nur ein geringes Signal detektiert werden kann. Im Unterschied zu chromatographischen Assays liegt bei Rezeptor-Bindungs-Assays generell keine lineare Funktion der Analyt-Konzentration vor (Findlay, 2007). Bei halblogarithmischer Auftragung des Signals gegen die Konzentration ergeben sich für nichtkompetitive bzw. kompetitive Assays die in Abbildung 2.8 skizzierten Dosis-Wirkungs-Kurven.

Bei beiden Assay-Varianten ergeben sich bei dieser Art der Auftragung sigmoidale Kurvenverläufe mit oberen und unteren asymptotischen Bereichen und einem dynamischen Bereich, innerhalb dessen ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration gilt. Der dynamische Bereich gibt somit den Arbeitsbereich vor, d.h. den Signal- bzw. Konzentrationsbereich, innerhalb welchem eine präzise Aussage über die Analyt-Konzentration in der Probe getroffen werden kann.

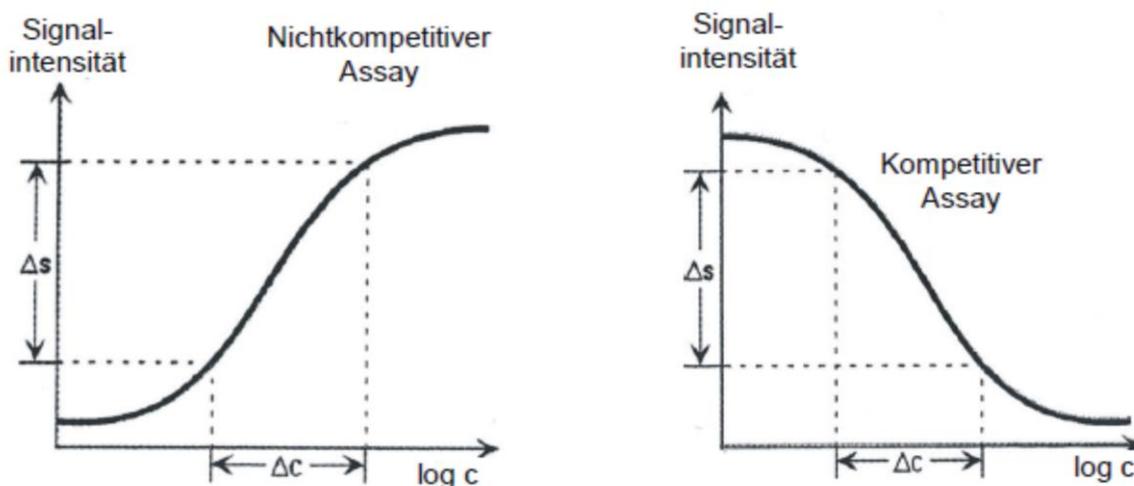


Abbildung 2.8: Kurvenverläufe von nichtkompetitiven bzw. kompetitiven Immunoassays mit direkter bzw. indirekter Proportionalität. Abbildung aus (Manz, 2004).

Ob diese Aussage qualitativ, semiquantitativ oder quantitativ gewertet werden kann, hängt im Einzelnen vom Anwendungszweck und den statistischen Daten im Rahmen einer Validierung der ELISA-Methode ab. Mathematisch beschrieben werden die sigmoidalen Kurven von Immunoassays gewöhnlich durch die 4-Parameter-Logistik-Funktion (*4-PL model*), die durch die folgende Gleichung wiedergegeben wird:

$$Y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B \right]} + D \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Dabei entspricht Y dem Messsignal, A und D entsprechen der oberen bzw. unteren Asymptote bei maximaler bzw. minimaler Analyt-Konzentration, c repräsentiert den Wendepunkt (IC_{50}) der Kurve und B steht für die Steigung am Wendepunkt (Findlay, 2007). Werden verschiedene Nachweismethoden verglichen, ist das Hauptkriterium in der Spurenanalytik die Nachweisstärke bzw. das Nachweisvermögen eines Assays, d.h. welche minimalen Analyt-Konzentrationen nachgewiesen werden können. Bei Immunoassays hat sich eingebürgert, die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) als Sensitivität des Assays zu bezeichnen. Dies ist vom Wortsinn her missverständlich, da die Sensitivität im eigentlichen Sinn das Ansprechverhalten eines Sensors bzw. Detektors beschreibt, d.h. den

Signalunterschied zwischen zwei Konzentrationen, welcher durch die Steigung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung charakterisiert wird. Erst bei Bezug auf den Signalunterschied zwischen der minimal nachweisbaren Analyt-Konzentration und der Blindprobe, der eine kritische Differenz von drei Standardabweichungen aufweisen sollte, beschreibt der Begriff der Sensitivität auch das Nachweisvermögen einer Methode.

Bei den Sigmoidalkurven von Immunoassays wird die Sensitivität bzw. das Ansprechverhalten durch die Steigung am Testmittelpunkt (IC_{50}) repräsentiert, welche ein wichtiges Charakteristikum eines Assays darstellt, da darüber der dynamische Bereich des Assays und damit der Arbeitsbereich der Nachweismethode definiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem Begriff „Sensitivität“ daher eine Aussage über den Anstieg des Messsignals mit zunehmender Antikörper-Konzentration der Probe getroffen, während eine Aussage über die minimale nachweisbare Konzentration unter den Begriffen „Nachweisstärke“ oder „Nachweisvermögen“ zum Ausdruck gebracht wird. Für die in der klinische Diagnostik meist geforderte qualitative Ja/Nein-Antwort ist allerdings weniger die minimal nachweisbare Analyt-Konzentration von Bedeutung, das Entscheidungskriterium stellt vielmehr der *Cut-Off*-Wert der Methode dar, auf dessen Basis ein belastbarer Befund getroffen werden kann. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch, dass die Begriffe „analytische Sensitivität“ und „diagnostische Sensitivität“ unterschiedliche Bedeutungen haben (siehe Kapitel 3.3.1).

Neben dem Test- und Detektionsprinzip von Immunoassays ist die Wahl der Plattform, d.h. welche feste Phase für die Assay-Durchführung gewählt wird, von Bedeutung. Die Wahl der Oberfläche spielt eine große Rolle in Bezug auf die Immobilisierung des Rezeptors (Butler, 2000).

Für die ELISA-Durchführung haben sich hier Mikrotiterplatten-Assays etabliert, in denen räumlich getrennt mehrere Assays parallel durchgeführt werden können und deren Signaldetektion mittels Lesegeräten standardisiert ist. Kunststoff-Titerplatten sind in einer großen Vielfalt an Bindungseigenschaften kommerziell erhältlich. Am häufigsten werden PS-Platten verwendet, bei denen die Anbindung der Rezeptoren über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt. Mikrotiterplatten-Assays sind einfach abzuarbeiten, allerdings kann eine Probe immer nur auf einen Analyten untersucht werden und die Methode ist damit nicht Multiplex-fähig.

Neben Kunststoffmaterialien dienen häufig Membranoberflächen als feste Phase von Immunoassays. ELISA-Nachweise basierend auf Membranen werden, abgeleitet vom *Western Blot*, als *Immunoblots* bezeichnet. Hier werden die Rezeptoren adsorptiv zumeist auf Nitrocellulose aufgebracht, welche eine deutlich größere Adsorptionsoberfläche besitzt als gleichgroße Plastikoberflächen (Butler, 2000). Im Unterschied zum Western Blot werden beim Immunoblot keine denaturierenden Bedingungen bei der Auftragung der Liganden gewählt. Die poröse Oberflächenstruktur der Membranen ermöglicht auch Fluss-Assays, die als *Lateral Flow*-Teststreifen – häufig als *Dip-sticks* bezeichnet – breite Anwendung wie z.B. für Schwangerschaftstests in der kommerziellen Diagnostik gefunden haben. Eine Weiterentwicklung des Immunoblots sind Teststreifen, bei denen nicht nur eine Art von Rezeptormolekül immobilisiert ist, sondern die Probe mit mehreren verschiedenen Rezeptoren reagieren kann. Dazu werden verschiedene Rezeptoren in diskreten Banden auf einen Teststreifen aufgebracht, der dann mit der Probe inkubiert wird. Dies kann z.B. dafür genutzt werden, die Reaktivität eines Zielmoleküls mit verschiedenen Rezeptorderivaten in einem Versuch auszutesten. So wurde in der vorliegenden Arbeit ein solcher linearisierter Immunoassay (*line immunoassay*, LIA) für die Auswahl eines geeigneten rekombinanten Antigens für den Nachweis von HEV-Antikörpern in Schweineseren verwendet. Dieses für die Humandiagnostik kommerziell erhältliche Teststreifen-Kit der Fa. Mikrogen (*recomLine HEV IgG/IgM*) enthält mehrere Antigenbanden, Reaktions- und Antikörperklassen- sowie eine Cut-Off-Kontrollbande (siehe Abbildung 2.9). Damit ist unter Umständen eine serologische Differenzierung zwischen verschiedenen Spezies oder Serotypen möglich, sofern keine Kreuzreaktivitäten auftreten.

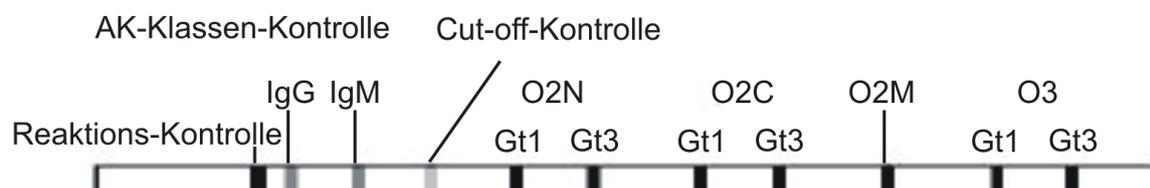


Abbildung 2.9: Aufbau eines LIA-Teststreifens am Beispiel des *recomLine HEV*-Teststreifens (Mikrogen).

Eine weitere Immunoassay-Plattform ist die Verwendung von magnetischen oder nichtmagnetischen Nanopartikeln als Träger von Rezeptoren (Martinez, 2010). Diese werden wie Mikrotiterplatten mit Fänger-molekülen beschichtet und können in die Probenlösung gegeben werden, wobei sie eine wesentlich größere Oberfläche für die Beschichtung und damit deutlich mehr an Bindekapazität bieten. Die Partikel können durch Oberflächenbehandlung auch für eine kovalente Kopplung von Rezeptoren funktionalisiert werden. Ein solcher *Bead-Assay* kommt z.B. beim Luminex®-xMAP-Verfahren der Luminex Corp. (Austin, USA) zum Einsatz. Um verschiedene Polystyrol-Mikrosphären und damit verschiedene Analyten zu unterscheiden, werden die Beads mit bestimmten Mengen eines Sets von zwei Fluorophoren ausgestattet, wobei das individuelle Mengenverhältnis eine spezifische spektrale Signatur ergibt (Elshal, 2006). Durch Veränderung der Mengenverhältnisse können so sehr viele Beads erzeugt werden, die Analyt-spezifisch ausgelesen werden können. Die Detektion dieses Multiplex-Assays erfolgt über einen Sekundärantikörper, der mit einem dritten Fluoreszenz-Farbstoff markiert ist, welcher analog zur Durchfluss-Zytometrie mittels Laserlichteinstrahlung angeregt wird. Mit dieser Methode können viele verschiedene Analyten gleichzeitig aus einer Probe mit geringem Volumen identifiziert werden. Luminex stellt *Bead-Kits* zur Verfügung, die vom Anwender mit den gewünschten Rezeptoren beschichten werden können. So ist auch ein *Bead-Assay* der Fa. Mikrogen zum Nachweis von enteropathogenen Yersinien in Seren auf dem Markt (*recomBead Yersinia IgG*), bei denen die Beads mit rekombinanten Antigenen beschichtet sind. Aktuell wurde von Owolodun *et al.* der Einsatz eines solchen Fluoreszenz-Mikrobead-basierten Immunoassays (FMIA) für den Nachweis von anti-HEV IgG in Schweineseren vorgestellt (Owolodun, 2013).

Eine weitere moderne Immunoassay-Variante sind Mikroarray-Immunoassays (MIA), bei denen das ELISA-Prinzip von den Kavitäten einer Titerplatte auf planare Träger übertragen wird. Durch eine gleichzeitige Miniaturisierung bei der Auftragung der Rezeptoren ist somit einerseits die Analyse vieler verschiedener Substanzen in einer Probe möglich, zum anderen können mit Mikroarray-Chips in Verbindung mit mikrofluidischen Systemen Immunoassays auch im Durchfluss-Prinzip durchgeführt werden. Die Anwendung dieser Technologie für den Nachweis von Antikörpern gegen Zoonoseerreger stand im Fokus der vorliegenden Arbeit. Das nachfolgende Kapitel soll zu dieser Thematik generelle Informationen liefern.

2.2.3 Mikroarray-Technologie

Eine moderne Methode, welche auch für Immunoassay-Experimente genutzt werden kann, ist die Mikroarray-Technologie. Der Begriff „Mikroarray“ beschreibt dabei, dass auf einem Träger in miniaturisierter Form Rezeptoren bzw. Liganden in einem vorgegebenen geordneten Raster aufgetragen werden, so dass bei der späteren Detektion eine Ortsauflösung stattfinden kann. Die Auftragung der Fängermoleküle erfolgt dabei meist in Form von mikroskopisch kleinen runden Flächen, den *Spots*.

Die Mikroarray-Technologie wird seit den 1990er Jahren angewendet und ist mittlerweile ein aus Zeit- und Kostengründen häufig gewähltes Hilfsmittel vor allem in der DNA-Analytik, bei der Tausende von Genexpressionsexperimenten parallel auf Basis immobilisierter DNA-Sonden durchgeführt werden können (Schna, 1995). Neben Gensonden können als Fängermoleküle eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Moleküle wie z.B. Antikörper, Antigene, Zellen, Haptene, Enzyme, Glykane oder Aptamere eingesetzt werden. Gerade Protein-Mikroarrays werden mittlerweile häufig im Bereich der *Proteomics* zur Aufschlüsselung von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Stoffwechsel verwendet und liefern zudem wichtige Informationen z.B. über die Wirkung von pharmakologisch relevanten Molekülen (Korf, 2005; Stoll, 2005). Neben diesen funktionellen Mikroarrays sind weitere Anwendungsbereiche auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der medizinischen Diagnostik zu finden, wo die Multiplex-Fähigkeit von analytischen Mikroarrays eine moderne Alternative zu Mikrotiterplatten-ELISAs darstellt und die Bestimmung mehrerer Analyten aus einer Probe in Form von *Sandwich*-Assays oder kompetitiven Assays ermöglicht (Rodriguez-Mozaz, 2007; Seidel, 2008). Damit lässt sich analog zu klassischen ELISAs eine große Bandbreite an niedermolekularen Substanzen wie Pharmazeutika, Pestiziden oder Toxinen nachweisen, aber auch größere Analyten wie Proteine oder Bakterien, jedoch mit der Option eines parallelen Nachweises. Im Bereich der Detektion von Pathogenen, die im Rahmen der Biosicherheit relevant sind (z.B. *Clostridium botulinum*, Ebola-Virus), gewinnen Mikroarray-Anwendungen auf Basis von DNA-Sonden und Antikörpern an Bedeutung (Uttamchandani, 2008). In der Spurenanalytik bringt die Miniaturisierung nicht nur den Vorteil eines Multianalyt-Systems mit sich, darüber hinaus sollten sich aufgrund der Verringerung der Rezeptormenge aus theoretischen Überlegungen zur Reaktionskinetik höhere Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse im Vergleich zu ELISAs erzielen lassen (Ekins, 1998).

Aufgrund der Möglichkeit einer vollständigen Automatisierung besitzt die Mikroarray-Technologie als Hochdurchsatz-System (*high throughput screening*, HTS) Potenzial als Methode für den Routineeinsatz.

Ein Unterschied zwischen verschiedenen Mikroarray-Systemen besteht in der Durchführung der Assay-Schritte. So existieren automatische Systeme, bei denen die Reaktionsflüssigkeiten genau dosiert auf den Spots des Mikroarray-Chips abgesetzt werden, andere Systeme kombinieren den Chip mit einem mikrofluidischen System, welches Durchfluss-Assays ermöglicht (Bange, 2005). Eine einfache Form stationärer Assays sind segmentierte Mikroarrays, bei denen die einzelnen Rezeptor-belegten Flächen entweder durch hydrophobe Barrieren oder durch Kavitäten analog zum ELISA-Design voneinander getrennt sind (Mendoza, 1999; Seidel, 2008). Während bei stationären Mikroarrays kein deutlicher Zeitgewinn bei den Inkubationsschritten im Vergleich zum konventionellen ELISA zu erzielen ist, können mikrofluidische Assays die Analysendauer deutlich reduzieren (siehe Kapitel 2.3.1.1).

Allen Mikroarray-Systemen gemeinsam ist die Anforderung, in Bezug auf die jeweilige Anwendung sowohl eine geeignete Chip-Oberflächenchemie für die Immobilisierung der Fängermoleküle zu etablieren als auch eine geeignete Form der Signalerzeugung und -auslesung zu entwickeln.

2.2.3.1 Allgemeine Grundlagen der Oberflächenchemie von Mikroarray-Chips

Die Durchführung präziser Affinitätsanalysen mittels der Mikroarray-Chip-Technologie erfordert qualitativ hochwertige Trägeroberflächen. Die Oberfläche muss einerseits die Rezeptormoleküle stark binden und andererseits unspezifische Adsorptionen z.B. von Matrix-Proteinen unterbinden.

Eine ideale Mikroarray-Chipoberfläche muss eben bzw. uniform sein und eine einheitliche, gleichmäßige Immobilisierung und Verteilung der Rezeptormoleküle gewährleisten. Dafür kommen planare Träger wie auch sphärische Partikel in Frage. Zudem sollte eine hohe Immobilisierungsausbeute erreicht werden können. Genauso wichtig ist eine gute sterische Zugänglichkeit der immobilisierten Spezies für die Zielmoleküle (Yalcin, 2009). Die Zugänglichkeit wird z.B. durch die Oberflächenstruktur und die dadurch erzielbare Belegungsdichte beeinflusst. Ein hohes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ist eine weitere Voraussetzung für die Anwendung. Dieses ergibt sich aus dem Verhältnis der spezifischen

Bindung der Analyten an den Fängern gegenüber unspezifischen Bindungen von Matrixbestandteilen und Detektormolekülen an der Oberfläche. Wichtig bei der Verwendung von Proteinen als Fängermoleküle ist, dass die Oberfläche nach Möglichkeit eine Stabilisierung der Proteine gewährleistet, so dass eine Denaturierung z.B. durch hydrophobe Wechselwirkungen verhindert wird.

Geeignete Trägermaterialien für Mikroarray-Chips sind Glas, Edelmetalle, Metalloxide, Silikone, Kunststoffe wie Polystyrol (PS) und andere Polymere wie PDMS (Angenendt, 2002; Bange, 2005; Kusnezow, 2003 a; North, 2010). Auch Nitrocellulose kann als Basis von Mikroarray-Oberflächen dienen (Seurynck-Servoss, 2007). Die Art des Trägermaterials richtet sich nach der Art der Immobilisierung, dem Detektionsprinzip und den Erfordernissen der jeweiligen Anwendung. Ein häufig verwendetes Trägermaterial für Mikroarray-Chips sind Objektträger aus Glas (Cras, 1999). Dieses Material zeichnet sich durch eine hohe physikalische und chemische Stabilität aus und besitzt exzellente optische Eigenschaften wie Transparenz und geringe Eigenfluoreszenz, so dass die Messsignale nicht gestört werden (North, 2010). Darüber hinaus ist Glas ein sehr kostengünstiges Ausgangsmaterial und die Silan-Oberfläche lässt sich relativ leicht und vielfältig aktivieren (Bange, 2005).

Die Modifizierung der ursprünglichen Materialoberfläche bis hin zur funktionalisierten biomimetischen Trägeroberfläche erfolgt meist durch einen schichtweisen Aufbau aus speziellen Untereinheiten verschiedener Beschichtungsmaterialien und *Linker*-Ketten. Die Anbindung unterschiedlicher Liganden am Trägermaterial kann durch Adsorption (Physisorption), ionische Wechselwirkungen, affine Wechselwirkungen, Selbstanordnungen (SAMs) oder kovalente Bindungen erreicht werden (Kusnezow, 2003 a; Peluso, 2003).

Die kovalente Anbindung bietet durch eine große Anzahl möglicher Kupplungsreaktionen vielfältige Möglichkeiten zur Immobilisierung und zeichnet sich durch eine besonders große Stabilität aus. Dies ist für Durchfluss-Mikroarray-Chips von großer Bedeutung, da hier eine Desorption der Fängermoleküle durch die auftretenden Scherkräfte vermieden werden muss. Eine Grundvoraussetzung für die kovalente Bindungsknüpfung ist das Vorhandensein aktiver funktioneller Gruppen bei den miteinander reagierenden Komponenten. Ist dies nicht der Fall, müssen die terminalen Gruppen mit Hilfe von Linkern wie z.B. Glutaraldehyd bzw. Photolinkern oder spezifischen Kupplungsreagenzien modifiziert bzw. aktiviert werden (Bhatia, 1989).

Um eine kovalente Bindung von Rezeptoren zu ermöglichen, müssen die Oberflächen zumeist aktiviert werden. Eine Ausnahme ist hier die bekannte Wechselwirkung von Goldoberflächen

mit Schwefelverbindungen. Verbindungen mit terminalen Thiolgruppen bzw. Linker wie Alkanthiole können dank ihrer hohen Affinität reproduzierbar Monolagen (SAMs) auf der Goldoberfläche bilden, so dass eine kovalente Kopplung allein durch die Funktionalität der Rezeptormoleküle in Form einer stabilen Au-S-Bindung möglich ist (Herne, 1997; Moses, 2004).

Bei oxidischen Oberflächen wie Glas ist die Silanisierung die effizienteste Variante, um terminale funktionelle Gruppen auf der Oberfläche einzuführen (Han, 2006). Die bekanntesten Silane, die zur Modifizierung von Glas- und Siliziumoxidsubstraten verwendet werden, sind die Alkoxysilane 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS/APTES), 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPTS) und 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPS/GOPTS) (Kusnezow, 2003 b). Die Art der endständigen funktionellen Gruppe der Silanschicht richtet sich nach den funktionellen Gruppen der zu immobilisierenden Liganden. In der Regel sind dies Amino-, Thiol-, Epoxy-, Hydroxyl-, Carbonyl- oder Carboxylgruppen.

In der Mikroarray-Chip-Technologie werden meist langkettige Polymer-Verbindungen oder Dendrimere als Linker zwischen Rezeptormolekül und Trägermaterialoberfläche eingesetzt. Aufgrund der hohen Variabilität ihrer Eigenschaften bieten Polymere die Möglichkeit zur gezielten Anpassung funktioneller Eigenschaften von Oberflächen. Wichtige Anforderungen an solche Polymere als Zwischenschicht zwischen Substrat und Ligand für den Einsatz in der Rückstandsanalytik sind eine hohe spezifische Belegungsdichte und eine effektive Abschirmung der Oberfläche gegen Proteinadsorptionen (Yalcin, 2009). Bekannte hydrophile Polymere bzw. Hydrogele für Sensoranwendungen sind Polyether, Polysaccharide wie Dextrane, Polyalkohole und Polyamide (Yakovleva, 2003). Ein Polymer, das in diesem Zusammenhang sehr detailliert untersucht wurde, ist Polyethylenglykol (PEG) (Schlapak, 2006). PEG-Beschichtungen eignen sich unter anderem zur Unterdrückung von unspezifischen Adsorptionen an der Oberfläche. Der proteinabweisende Effekt von PEG-Schichten wird im Allgemeinen mit Eigenschaften der Polymerketten wie Hydrophilie, Flexibilität und Mobilität begründet (Kannan, 2006; Pasche, 2005; Piehler, 2000). Es werden sehr homogene, dünne Beschichtungen erreicht, die eine hohe Belegungsdichte mit Antikörpern aufweisen (Wolter, 2007). Die Hydrophilie der PEG-Schicht minimiert auch das Risiko von Protein-Denaturierungen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (Wan, 2009). Für die kovalente Anbindung von Rezeptoren bieten verschiedene Hersteller mittlerweile eine Vielzahl an kommerziellen aktivierten Trägern an, welche auf unterschiedlichen Polymerstrukturen basieren und damit je nach zu immobilisierendem Liganden

unterschiedliche Belegungsdichten und Adsorptionseigenschaften zur Wahl stellen (Seuryneck-Servoss, 2007).

2.2.2.2 Immobilisierung von Proteinen

Die Ursprünge in der Entwicklung von Immobilisierungsmethoden für Mikroarray-Anwendungen liegen wie bereits erwähnt in der Entwicklung von DNA-Chips. Ausgehend von den hierfür erfolgreich getesteten Trägermaterialien und Kopplungstechniken wurde diese Technologie auf die Entwicklung von Protein-Chips übertragen. Allerdings sind Proteine chemisch und strukturell wesentlich komplexer aufgebaut als Nukleinsäuren (Kusnezow, 2003 a). Neben der Funktionalisierung von Ligand und Oberfläche ist für Proteine von zentraler Bedeutung, dass diese durch den Kopplungsvorgang und die Bindung an der Festphase ihre Struktur nicht verändern und damit ihre biochemische Aktivität gewährleistet bleibt. Daher müssen Prozesse wie Dehydrierung, Oxidation oder Denaturierung nach Möglichkeit vermieden werden (Kusnezow, 2003 a).

Der Erhalt der aktiven Konformation während und nach dem Immobilisierungsvorgang ist somit der Schlüssel für einen nachweisstarken Protein-Mikroarray-Immunoassay.

Nachdem für analytische Mikroarrays häufig als Fängermoleküle Antikörper zum Einsatz kommen, existieren zahlreiche Forschungsarbeiten, die sich mit geeigneten Oberflächenstrategien hinsichtlich der Kopplungsmethode, der Funktionalisierung von Antikörpern und Oberfläche für eine hohe Kopplungsausbeute sowie der verwendeten Beschichtungspuffer für den Erhalt der Aktivität der Antikörper beschäftigen (Haab, 2000; Kusnezow, 2003 b; Lee, 2002; Peluso, 2003).

Die Verwendung von rekombinanten Antigenen (rAgs) als Rezeptoren ist dagegen eine Mikroarray-Anwendung, die bisher noch selten eingesetzt und daher erst in wenigen Forschungsarbeiten veröffentlicht wurde. Einige wenige Mikroarray-Anwendungen, welche auf rekombinanten Antigenen basieren, wurden zur Bestimmung von Autoantikörpern (Feng, 2004) oder zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen Herpes- und Hanta-Viren bzw. gegen Hepatitis B in Seren veröffentlicht (Jaaskelainen, 2009; Moreno-Bondi, 2006). Von Fall *et al.* und Heyries *et al.* wurden Durchfluss-Biochip-Assays mit Chemilumineszenz-Detektion basierend auf rekombinanten Proteinen zur Detektion von Allergen-Antikörpern entwickelt (Fall, 2003; Heyries, 2008). Im Unterschied zu Antikörpern sind rekombinante Antigene nicht durch eine native Gesamtstruktur in ihrer Konformation konserviert, sondern bilden im

Wesentlichen das Bindungsmotiv des Gesamtproteins ab. Dadurch liegt eine eingeschränkte Stabilität vor, was bereits in Lösung das Risiko von Aggregationen erhöht (Chi, 2003).

Als Orientierung für die Entwicklung von Antigen-Mikroarrays können allgemeingültige Grundlagen aus den Erkenntnissen mit Antikörper-Mikroarrays und den Techniken zur Immobilisierung von Proteinen in Western Blot- bzw. Immunoblot-Methoden herangezogen werden. Allgemein geht der Trend bei der Entwicklung von Protein-Mikroarrays dahin, dass viele Forschungsgruppen aufgrund der Komplexität der Etablierung einer optimalen Oberflächen- und Kopplungsstrategie keine eigenen modifizierten Oberflächen entwickeln, sondern die mittlerweile große Vielfalt an kommerziell verfügbaren Trägermaterialien und Chips nutzen, um durch Tests verschiedener Chipoberflächen die beste Assay-Performance zu finden (Seurynck-Servoss, 2007). Diese Vorgehensweise ist jedoch sehr kostspielig und mit einem großen Testaufwand und Reagenzienverbrauch verbunden.

Für die Immobilisierung von Proteinen bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Zum einen können die Proteine durch ungerichtete Adsorption aufgebracht werden, zum anderen über kovalente Anbindung. Daneben werden auch Methoden eingesetzt, die Affinitäten für die Bindung an der Oberfläche ausnutzen, z.B. Biotin-(Strept)Avidin-Systeme oder die Beschichtung mit Protein A/G zur orientierten Affinitätsbindung von IgG-Antikörpern über ihren F_c-Teil (De Palma, 2007; Yakovleva, 2003).

Die einfachste Möglichkeit, Proteine auf Oberflächen zu immobilisieren, ist die unspezifische bzw. passive Adsorption über hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen. Gute Adsorptionseigenschaften bieten Trägermaterialien aus Kunststoff wie Polystyrol (PS), Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) (Zhu, 2003). Ebenfalls eingesetzt werden Glasoberflächen, welche für die Adsorption von Proteinen mit dünnen Filmen von Polymeren wie Poly-L-Lysin (PLL) oder Gelmaterialien wie Polyacrylamid oder Agarose beschichtet sind (Arenkov, 2000; Zhu, 2003). Auch Nitrocellulose wird häufig zur Beschichtung von Trägern und Membranen verwendet (z.B. Whatman FAST Slides).

Der Vorteil der Immobilisierung mittels Adsorption liegt in der Einfachheit der Methode, da keine Reinigungs- und Aktivierungsschritte für eine Oberflächenfunktionalisierung erforderlich sind. Die ungerichtete Anbindung der Proteine bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass keine Orientierung der Moleküle vorgegeben wird. Als Folge präsentiert ein Großteil der adsorbierten Rezeptoren seine Bindungsstellen nicht in Richtung der Analyten

und kann somit keine Aktivität im Assay zeigen. Bei Antikörpern stehen zum Teil weniger als 10 % der immobilisierten Fänger tatsächlich für eine Bindung zur Verfügung (Butler, 2000). Bei PS-Oberflächen kann die passive Adsorption mit einer Konformationsänderung von Proteinen einhergehen, indem hydrophobe Seitenketten starke hydrophobe Wechselwirkungen mit der Oberfläche eingehen und sich dadurch die Raumstruktur ändert (Butler, 2000). Aufgrund der wesentlich höheren Bindungskapazität verbleiben auf den dreidimensionalen Nitrocellulose-Schichten absolut gesehen mehr aktive Rezeptoren, so dass dort bessere Signale resultieren.

Da keine strukturierten Oberflächen vorliegen, kann über einfache Adsorption darüber hinausgehend kein Einfluss auf die Belegungsdichte genommen werden. Die Beschaffenheit des Trägermaterials bietet keine Kontrolle über die Adsorption unerwünschter Proteine aus der Matrix bei der Assay-Durchführung, so dass aufwendige Schritte zur Blockierung der Oberfläche erforderlich sind und häufig nur ein geringes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erzielt werden kann (Seidel, 2008).

Die kovalente Bindungsstrategie bietet in dieser Hinsicht einen großen Gestaltungsfreiraum bei der Wahl der Beschichtungsmaterialien, Linkermoleküle und Aktivierungsmethoden, ist dadurch in der Umsetzung jedoch mit einem wesentlich größeren Aufwand verbunden. Die kovalente Bindung gewährleistet eine stabile permanente Anbindung der Liganden, wobei in Abhängigkeit von den Belegungseigenschaften der Oberflächen und der lokalen Ligandenkonzentration während der Immobilisierung auch adsorptiv gebundene Liganden vorliegen können, welche nach dem Immobilisierungsprozess abgewaschen werden müssen. Eine kovalente Bindungsstrategie ist gerade für Durchfluss-Assays zu bevorzugen, da hier die Ablösung der Rezeptoren infolge der auftretenden Scherkräfte durch die permanente Bindung verhindert werden sollte. Ist dies gewährleistet, so ist darüber hinaus die Grundlage für eine wiederwendbare, d.h. regenerierbare Sensoroberfläche geschaffen, die aus ökonomischer Sicht ein Ziel für Mikroarray-Anwendungen ist.

Generell ist für die kovalente Kopplung wichtig, über welche funktionellen Gruppen das Protein verfügt und ob das Protein direkt gekoppelt oder Linker als Abstandshalter (*spacer*) verwendet werden. Als Bindungspartner stehen bei Proteinen vor allem primäre Aminogruppen von Aminosäuren wie Lysin oder Arginin zur Verfügung, welche an Oberflächen mit elektrophilen Funktionalitäten wie Epoxiden, Aldehyden oder Aktivestern binden können. Des Weiteren kann die Bindung über freie Thiole von Cysteinen an

Maleimid-Oberflächen erfolgen (Kusnezow, 2003 b). Auch bei der kovalenten Immobilisierung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindungsstelle des Rezeptors für den Antigen-Antikörper-Komplex durch die Anbindung an der Oberfläche nicht zugänglich ist (sterische Hinderung). Liegen mehrere funktionelle Gruppen über das Molekül verteilt vor, so ergibt sich eine Mischung aus gebundenen Molekülen mit geeigneter und ungeeigneter Orientierung. Bei Antikörpern bietet es sich daher an, nach Möglichkeit für die Kopplung die funktionellen Gruppen der vorhandenen Zuckerreste zu nutzen und damit den Bereich des Paratops nicht zu blockieren (Shriver-Lake, 1997). Eine andere Möglichkeit bietet sich durch die verstärkt eingesetzten rekombinanten Herstellungsmethoden. So können bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen gezielt Linker oder Affinitäts-*Tags* mitexprimiert werden, über welche eine Kopplung an unproblematischen Positionen abseits der Bindungsstelle erfolgen kann.

Im Unterschied zur Adsorption, bei der die Anbindung über mehrere nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgt, blockiert die Ausbildung einer einzigen kovalenten Bindung weniger Raum und sollte daher generell zu einer besseren Zugänglichkeit führen (Wan, 2009). Um dennoch einen Abstand zwischen Protein und Oberfläche zu gewährleisten und damit eine Exponierung der Antigen-Bindungsstellen zu erreichen, soll in dieser Arbeit die Einführung eines langkettigen Diamino-PEGs als homobisfunktionellem Linker dienen (Weimer, 2000; Wolter, 2007). Dieser kann kovalent an die silanisierte Glasoberfläche gekoppelt werden und bietet mit seiner terminalen Aminogruppe die Möglichkeit einer weiteren Funktionalisierung bzw. Aktivierung. Neben ihrer Funktion als Spacer haben sich PEG-Hydrogele wie bereits erwähnt aufgrund ihres positiven Effekts zur Reduzierung unspezifischer Proteinadsorptionen aus der Matrix bewährt, was zusammen mit ihrem stabilisierenden Effekt auf die immobilisierten Proteine einem Verlust der Rezeptoraktivität entgegenwirken soll (Lee, 2002, Wan, 2009).

2.2.2.3 Technische Realisierung der Immobilisierung

Ein wichtiger praktischer Aspekt bei der Herstellung von Mikroarray-Oberflächen ist die Wahl der Methode für die Auftragung der Rezeptoren. Bei Mikroarray-Chips müssen diese in kleinen Mengen (Nanoliter-Bereich) sehr definiert und homogen auf dem Träger abgesetzt werden. Die technische Umsetzung dieses Prozesses erfolgt mittels *patterning* oder *spotting*. Grundsätzlich können für die Realisierung zwei Methoden unterschieden werden. Zum einen

kann die Übertragung der Biomoleküle durch Kontakt-Transfer (*contact printing*), zum anderen durch kontaktlose Auftragung (*non-contact printing*) erfolgen. Für beide Varianten stehen seit dem Aufkommen der DNA-Mikroarray-Technologie Roboter- und automatisierte Pipettier-Systeme verschiedener Hersteller zur Verfügung. Die Auftragung kann in beiden Fällen seriell, d.h. Spot für Spot, bzw. parallel erfolgen, was sich auf die benötigten Prozesszeiten und damit den Durchsatz bei der Chip-Produktion auswirkt. Die Wahl der Methode hängt daher stark vom Design und Anwendungszweck des Biochips ab.

Eine gute Übersicht über die verschiedenen Auftragsvarianten wird von Barbulovic-Nad *et al.* gegeben (Barbulovic-Nad, 2006).

Bei der kontaktlosen Auftragung existieren vielerlei Methoden, wie die Rezeptormoleküle ohne physikalischen Kontakt mit der Oberfläche deponiert werden können. Die am häufigsten verwendeten Geräte für das kontaktlose Übertragen von Rezeptorlösungen sind *dispenser*, welche Flüssigkeitströpfchen mittels *inkjet-printing* oder *electrospray deposition* ohne direkten Kontakt auf das Substrat auftragen (Avseenko, 2001; Gutmann, 2004). Bei der Inkjet-Technologie kann wiederum zwischen einer thermalen (*bubble jet*) und einer piezoelektrischen Tröpfchenerzeugung unterschieden werden (Allain, 2004). Bei der piezoelektrischen Variante werden durch Anlegen einer Wechselspannung Oberflächenwellen erzeugt, welche die Flüssigkeit verdrängen und zur Abgabe eines Flüssigkeitstropfens ohne direkten Kontakt an die Chipoberfläche führen. Nachdem mit den ersten Systemen nur weiche Materialien wie Agarose oder Nitrocellulose als Träger belegt wurden, ist der Entwicklungsstand moderner Dispenser wie z.B. der *sciFLEXARRAYER*-Systeme von Scienion (Berlin) soweit fortgeschritten, dass auch harte Trägermaterialien und *Wafer* mit homogenen Spots belegt werden können. Es können verschiedene Einstellmöglichkeiten über die angelegte Spannung und die Zahl der versprühten Tröpfchen pro Spot getroffen werden, worüber die Spotgröße beeinflusst werden kann.

Bei der Elektrospray-Deposition befindet sich eine dielektrische Maske zwischen den Kapillaren und dem Substrat. Durch Anlegen eines elektrostatischen Feldes wird die Flüssigkeit durch die freien Stellen der Maske auf den Träger gesprüht, wobei die Spotgröße über das Design der Maske reguliert wird. Diese Technik ist einfach zu parallelisieren und eignet sich daher für die schnelle Herstellung von Oberflächen, die Limitierung liegt hier jedoch in der Spotdichte (Barbulovic-Nad, 2006)

Der Vorteil der kontaktlosen Printer liegt in der Schnelligkeit des Vorgangs, der besonders für Hochdurchsatz-Anwendungen im Bereich der DNA-Mikroarrays geeignet ist. Ein weiterer

Vorteil gegenüber Kontakt-Printern ist der Verzicht auf Pins, welche je nach Trägermaterial zu einer Beschädigung der Beschichtung führen können.

Die Kontakt-basierten Pipettiersysteme finden dennoch auch aktuell ihre Anwendung, da ihr Vorteil in der einfachen Kontrolle des Prozesses liegt und ein präzises Absetzen von Tröpfchen durch Software-gesteuerte Roboterarme erlaubt. Darüber hinaus ist das direkte Absetzen der Lösungen auf dem Träger hinsichtlich der Verwendung von Lösungsmitteln und Zusätzen variabler, da bei der Verwendung von Kapillar-Düsen die Gefahr der Verstopfung besteht und für das Versprühen der Lösungen eine Limitierung in Bezug auf die Viskosität der Lösung besteht, was bei hohen Proteinkonzentrationen oder viskosen Additiven Probleme bereiten kann (Delaney, 2009). Da für die Immobilisierung von Proteinen auch Stabilitäts- und Aktivitätsaspekte berücksichtigt werden müssen, ist hier das Kontaktverfahren vorteilhaft, da der komplette Prozess bei Raumtemperatur oder gekühlt stattfindet, während z.B. bei der thermalen Dispensier-Methode die Lösung bei ca. 200 °C verdampft wird (Okamoto, 2000).

Beim Kontaktdrucken werden die Lösungen mit Hilfe einer Nadel (*pin*) aus dem Reservoir aufgenommen und mit hoher Präzision an der ausgewählten Position auf dem Chip wieder abgegeben. Der Pin kommt beim Absetzen des Flüssigkeitstropfens in direkten Kontakt mit der Mikroarray-Chipoberfläche. Materialien für die Pins sind meist Stahl, Quarz oder auch PDMS, welches für elastische Stempel (*microstamps*) verwendet wird (Quist, 2005). Es wurden darüber hinaus verschiedene Geometrien der Spitze getestet, um die Größe der damit abgesetzten Spots zu beeinflussen. Bei der in der Arbeit verwendeten Methode des Kontaktdrucks handelt es sich um ein *solid-pin*-System, bei der die Nadel die Gestalt eines Nagels hat (siehe Abbildung 2.10).

Die durch Benetzung der Nadel übertragenen Volumina liegen bei diesem Verfahren im Nanoliter-Bereich. Für die Erzeugung jedes einzelnen Spots wird neue Flüssigkeit aufgenommen und vor dem Eintauchen in ein Reservoir mit anderem Inhalt erfolgt ein Waschschrift, um eine Kreuzkontaminierung zu vermeiden. Diese Prozedur führt zu einem höheren Zeitaufwand verglichen mit der kontaktlosen Immobilisierungstechnik. Neben diesem sehr einfachen Pin-Design werden häufig Pins eingesetzt, die mittels eines schmalen Spalts (*split*) durch Kapillarkräfte ein definiertes größeres Volumen der Spottinglösung aufnehmen können. Mit diesen *split-pins* können somit mehrere Spots pro Ladevorgang abgesetzt werden. Unabhängig vom Pin-Design kommen sowohl Druckköpfe mit einzelnen Pins als auch Druckköpfe mit mehreren Pins zum parallelen Spotting zum Einsatz.

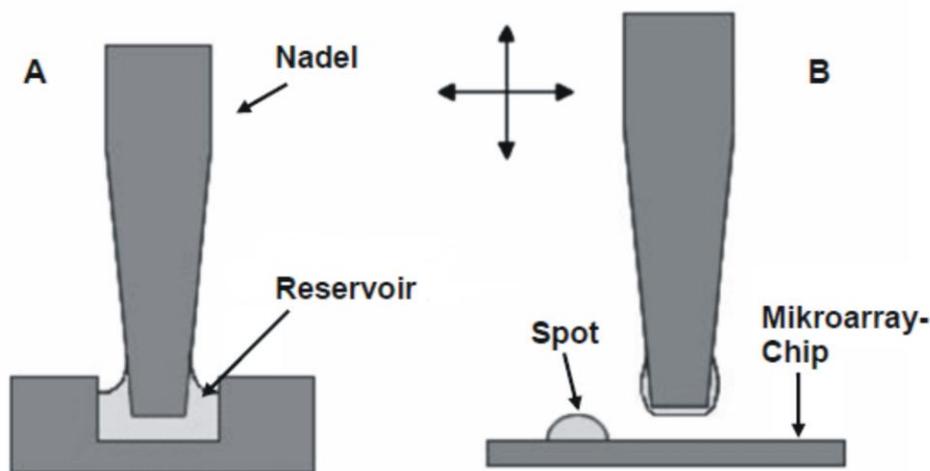


Abbildung 2.10: Prinzip des Kontaktdruck-Verfahrens mittels *solid pin*. Aufnahme der Proteinlösung aus dem Reservoir (A) und Übertragung der Lösung durch direkten Kontakt mit der Oberfläche des Substrates (B). Abbildung modifiziert nach (Barbulovic-Nad, 2006).

Allgemein hängt die Morphologie der Spots beim Kontaktprint vom Benetzungsverhalten ab, das sich aus physikalischen Parametern wie der Oberflächenspannung und den wirkenden Adsorptionskräften an den Grenzschichten zwischen Substrat, Flüssigkeitstropfen und Nadelspitze ergibt. Charakterisiert werden kann das Benetzungsverhalten über den Kontaktwinkel des abgesetzten Tropfens auf der Oberfläche. Daneben spielen Temperatur und Luftfeuchtigkeit eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Trocknungsverhalten und damit neben der Form der Spots auch für das Auftreten von Denaturierungseffekten bereits während des Spottingvorganges. Um die Uniformität der Spots zu gewährleisten, muss also eine Kontrolle der äußeren Bedingungen gewährleistet sein und der Spottingpuffer gegebenenfalls mit Additiven, welche das Trocknungsverhalten beeinflussen, versetzt werden (Dufva, 2005). Im Vergleich zu modernen kontaktlosen Techniken ist gerade der Kontaktprint mit nur einer Nadel aufgrund seiner langen Prozessdauer und seiner damit verbundenen Anfälligkeit gegenüber Veränderungen der Umgebungsbedingungen nicht mehr die Methode der Wahl. Darüber hinaus muss, bezogen auf das tatsächliche Übertragungsvolumen, ein großer Überschuss an Spottinglösung vorgelegt werden, was bei limitierter Rezeptormenge nachteilig ist. Für Forschungsarbeiten und Prinzipstudien können durch Optimierung der Oberflächenchemie dennoch zufriedenstellende Reproduzierbarkeiten erzielt werden.

2.2.2.3 Detektionsverfahren

Während für konventionelle ELISAs weiterhin die Detektion mittels chromogener Substrate gebräuchlich ist, welche ein bereits mit bloßem Auge sichtbares Signal liefern, benötigen Mikroarrays aufgrund der Miniaturisierung Detektionssysteme, welche die Antigen-Antikörper-Reaktion von wenigen Molekülen verlässlich, hoch sensitiv und in hoher Ortsauflösung nachweisen können, um eine Vielzahl an Spots und damit an verschiedenen Analyten zu erfassen. Die Detektion und Quantifizierung der an der Mikroarray-Oberfläche ablaufenden Reaktionen kann sowohl über Chemilumineszenz- oder Fluoreszenzmessungen als auch über elektrochemische Messungen oder markierungsfrei, z.B. über Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), erfolgen.

Im Bereich der DNA- und Protein-Mikroarrays basieren die meisten optischen Detektionsverfahren auf der Fluoreszenz-Auslesung.

Um einen Mikroarray mittels Fluoreszenz auszulesen, wird der zugegebene Reaktionspartner mit einem Fluorophor über kovalente Bindung markiert. Verbreitete Fluoreszenzmarker (*fluorescent label*) sind Fluorescein, Rhodamin-Derivate oder Cyanin (Cy)-Farbstoffe (Bally, 2006; Schäferling, 2006). Bei Genexpressionsexperimenten können verschiedene Bindungspartner an den Sonden diskriminiert werden, indem Fluorophore mit verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen den exprimierten DNA-Sequenzen zugeordnet werden und die Detektion bei verschiedenen Wellenlängen erfolgt. Anstelle eines kleinen organischen Fluorophors können auch Fluoreszenzproteine wie GFP (*green fluorescent protein*) oder *quantum dots* für die Detektion ausgenutzt werden (Robelek, 2004). Bei analytischen Mikroarrays, welche auf ELISA-Formaten basieren, erfolgt die Signalgenerierung häufig nicht über direkte Markierung des Analyten, sondern über Enzym-markierte Detektionsantikörper. Hier können sowohl fluoreszierende wie auch lumineszierende oder chromogene Substrate umgesetzt werden. Für die häufig verwendeten Enzyme Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP) können die Substrate Thyramid bzw. AttoPhos für die Fluoreszenz-Auslesung von Immunoassays eingesetzt werden (Cano, 1992; Schäferling, 2006).

Die Erzeugung und Auslesung des Fluoreszenz-Signals von stationären Mikroarrays erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Laser-Scannern, die in verschiedenen Ausführungen kommerziell verfügbar sind. Dabei wird die Mikroarray-Oberfläche mit Laserlicht der gewünschten Wellenlänge bestrahlt und die emittierten Photonen mittels Photomultipliern (*photo multiplier*

tubes, PMT) detektiert (Bally, 2006). Beim *microarray imaging* erfolgt die Anregung durch Weißlicht, welches durch Halogenlampen oder eines Arrays von LEDs (*light emitting diodes*) generiert wird, anstelle von PMTs dient eine CCD (*charge-coupled device*)-Kamera zur Detektion (Schäferling, 2006). Während beim *microarray scanning* der Laser in einer bestimmten Ortsauflösung und definierten Zeitintervall die Fläche des Mikroarrays abrastert, wird beim *microarray imaging* ein stationäres Bild der gesamten Oberfläche in einer durch den CCD-Chip definierten Auflösung für eine bestimmte Emissionsdauer aufgenommen.

Neben diesen einfachen Techniken zur Fluoreszenz-Auslesung existieren auch komplexere Ausleseverfahren, die sich einer Kombination der SPR (*surface plasmon resonance*)-Technologie und der Fluoreszenz bedienen.

Die SPR-Technik für sich genommen stellt eine in der Biosensorik und gerade zur Messung von Reaktionskinetiken wie z.B. zur Bestimmung von Antikörperaffinitäten gerne verwendete markierungsfreie Detektionsmethode mit Echtzeitauflösung dar (Homola, 1999). Für die Auslesung von Mikroarray-Immunoassays kann diese Technik ebenfalls verwendet werden, verbunden mit dem Vorteil, dass keine Detektionsantikörper benötigt werden (Kanda, 2004).

Oberflächenplasmonen sind kollektive Oszillationen freier Elektronen in sehr dünnen Edelmetallfilmen, zumeist aus Gold oder Titan. Sie entstehen, wenn Leitungselektronen durch einfallende Photonen unter der Bedingung einer totalen internen Reflexion in eine resonante Schwingung versetzt werden. Der Resonanzeffekt in diesem evaneszenten Feld wird durch die Eigenschaften der Grenzfläche und der Oberflächenbeschichtung bestimmt. Chemische und physikalische Änderungen in der Grenzschicht bzw. die Wechselwirkungen von Analyten mit immobilisierten Rezeptoren führen zu einer massenabhängigen Verschiebung der Resonanzfrequenz. Diese auftretende Verschiebung kann mit hoher Präzision über die Änderung des Brechungsindex detektiert werden, so dass sich geringste Konzentrationsänderungen auf der Sensor-Chipoberfläche quantifizieren lassen (Berger, 1998). Neben den bekanntesten kommerziellen SPR-basierten Messgeräten, den BIAcore-Systemen (GE Healthcare, UK), mit welchen teilweise auch eine parallele Detektion verschiedener Analyte möglich ist, wurden auch portable mikrofluidische Geräte mit mehreren Kanälen zur Bestimmung verschiedener Parameter aus einer Probe entwickelt (Dostalek, 2007; Fernandez, 2010).

Der Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz kann für Fluoreszenzmessungen genutzt werden, da dadurch eine verstärkte lokale Anregung von Fluorophoren an der Oberfläche erreicht werden kann, was sich in einer Erhöhung des Nachweisvermögens widerspiegelt.

Diese Technik wird als *surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy* (SPFS) bezeichnet und wurde bereits für den Nachweis von Markern in der Serumdiagnostik erprobt (Liebermann, 2003; Schotten, 2013).

Eine weitere fortschrittliche Methode zur Fluoreszenz-Detektion unter der Bedingung der Totalreflexion ist die TIRF-Technik (*total internal reflection fluorescence*). Auch hier wird durch eine Laserdiode (635 nm) Licht in einen Glaswellenleiter eingekoppelt und ein evaneszentes Feld an der Grenzschicht zwischen dem Sensorsubstrat (hoher Brechungsindex), welches als *Transducer* fungiert, und dem Medium (niedriger Brechungsindex) erzeugt (Tschmelak, 2005 a). Da die Feldstärke exponentiell mit der Entfernung von der Oberfläche abnimmt, werden nur die oberflächennahen Fluorophore angeregt (Taitt, 2005). Am *Naval Research Laboratory* (Washington, USA) wurde der *NRL Array Biosensor* seit 2003 als Multianalyt-Fluoroassay-Plattform für die Detektion pathogener Erreger und Toxine auf Basis der Fluoreszenz-Anregung mittels eines evaneszenten Feldes eingesetzt (Taitt, 2005; Taitt, 2008).

Ein Problem bei Einsatz der Fluoreszenz für Mikroarrays ist die häufig auftretende Hintergrund-Fluoreszenz bzw. das Streulicht des Trägermaterials und der Matrix, welche sich negativ auf das SNR auswirkt.

Neben der Fluoreszenz-Auslesung hat die auf Chemilumineszenz (CL) basierende Detektion in den letzten Jahren breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Analytik gefunden (Roda, 2005; Seidel, 2008). Bei der Chemilumineszenz werden als Folge einer chemischen Reaktion Photonen frei, welche in Ortsauflösung detektiert werden können. Da keine externen Lichtquellen wie z.B. Laser benötigt werden, ist der optische Aufbau relativ einfach. Der Vorteil der CL-Detektion liegt darin begründet, dass keine Instabilitäten einer externen Lichtquelle und keine störenden Streueffekte auftreten können, wodurch das Hintergrundsignal sehr gering ist. Die Messung des emittierten Lichts in Form einer 2D-Auslesung erfolgt mit Hilfe von hochsensitiven CCD oder CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*)-Chips, die bereits geringe Lichtintensitäten aufnehmen können. Die zugrunde liegende CL-Reaktion beruht zumeist auf einer Enzym-katalysierten Substratumsetzung, was den Nachteil einer Temperaturabhängigkeit des Signals mit sich bringt und somit einer Temperaturkontrolle bedingt. Häufig eingesetzt wird die Kombination aus dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit den CL-Substraten Luminol und Wasserstoffperoxid. Das Emissionsspektrum für die Reaktion von Luminol weist ein

Maximum bei 425 nm auf, die Quantenausbeute für diese Reaktion ist mit 1 % sehr gering (Marquette, 2006 a).

Die wesentlichen Schritte, die zur Photonenemission führen, sind in Abbildung 2.11 gezeigt. Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird oxidiert, was zur Bildung eines angeregten Aminophthalat-Ions führt, das bei Relaxation in den Grundzustand Licht emittiert. Die resultierende Intensität des Messsignals hängt von Konzentration des Substrates, der Umgebungstemperatur und der Auslesedauer, d.h. der Belichtungszeit des Chips, ab.

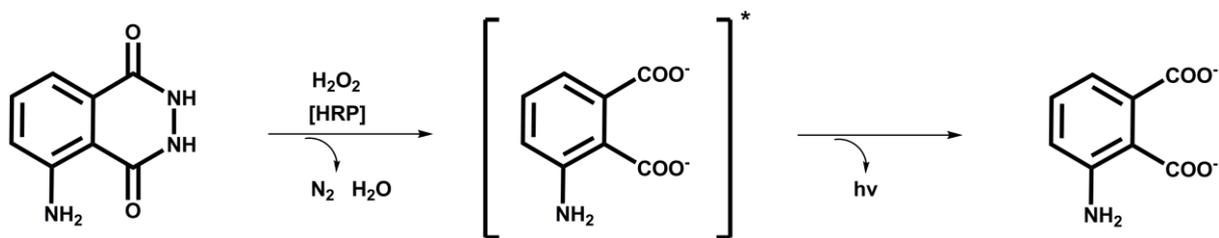


Abbildung 2.11: Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid unter Enzymkatalyse.

Die Verwendung von HRP-markierten Detektionsantikörpern zur CL-Auslesung von Protein-Mikroarrays wurde zum ersten Mal von Joos *et al.* veröffentlicht (Joos, 2001). Mittlerweile wird die hohe Sensitivität und Nachweisstärke der CL-Auslesung, die sich in gegenüber der Fluoreszenz-Auslesung höheren SNR-Werten niederschlägt, sowohl für analytische Immunoassays als auch DNA-Hybridisierungs-Assays als Methode der Wahl eingesetzt (Roda, 2012). Für die Entwicklung von Biosensoren ist aus konstruktiver Sichtweise vorteilhaft, dass keine Lichtquellen, Filter und anderen optischen Bauteile erforderlich sind, was die Miniaturisierung vereinfacht. Optimierungsbedarf bei der Signalerzeugung ist aufgrund der geringen Quantenausbeute der Luminol-Umsetzung gegeben, so dass die Suche nach wirkungsvollen Signalverstärkern (*enhancer*), Katalysatoren und alternativen Substraten ein aktuelles Forschungsanliegen ist (Bhandari, 2010; Roda, 2012; Seidel, 2010; Tsunoda, 2009). Neben niedermolekularen organischen Molekülen wie Boronsäuren bzw. Boraten oder Phenol-Derivaten wie *p*-Iodophenol (PIP) als effektive Emissionsverstärker sind auch Metalle als CL-Verstärker untersucht worden. Hier wird ähnlich wie bei der Fluoreszenz-Verstärkung der SPR-Effekt an dünnen Metallfilmen ausgenutzt (Aslan, 2009). Eine weitere moderne Technologie, die von der Fluoreszenz-Auslesung auf die Chemilumineszenz übertragen wurde, sind sogenannte CRET (*chemiluminescence resonance energy transfer*)-Immunoassays, bei denen anstelle eines Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren wie

beim FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) die Anregung des Donors mittels einer CL-Reaktion erfolgt, der durch an Goldnanopartikel gebundenes HRP nach Luminol-Zugabe repräsentiert wird (Huang, 2011).

Als Alternative zu HRP werden häufig die Alkalische Phosphatase (AP) oder Acridiniumester als CL-Label verwendet (Seidel, 2010). Daneben ist die Elektrochemilumineszenz ebenfalls eine Technik, die für bioanalytische Zwecke genutzt werden kann (Tsunoda, 2009).

Neben den genannten Detektionsverfahren für funktionelle und analytische Mikroarrays stehen noch einige weitere Techniken zur Auslesung zur Verfügung. Im Bereich der markierungsfreien Detektion sind z.B. die Ellipsometrie (Schäferling, 2006; Niu, 2011) und die SPR-Interferometrie (Kim, 2007) für die Mikroarray-Auslesung getestet worden. Auch das Raman-Signal kann in Form der SERS (*surface-enhanced Raman spectroscopy*)-Technik an planaren Trägern oder *core-shell*-Partikeln zur spezifischen Detektion von DNA-Zielstrukturen oder Bakterien ausgenutzt werden (Knauer, 2011; Li, 2012; Wang, 2012). Für Bakterien liefert die Raman-Mikroskopie spezifische *whole cell fingerprint*-Spektren in Ortsauflösung, deren Signale in der Nähe von Silber- oder Goldnanopartikeln deutlich verstärkt werden können, so dass sogar eine *single molecule*-Detektion möglich ist.

Auch elektrochemische Ausleseverfahren mittels Amperometrie, Voltammetrie oder Impedanz-Spektroskopie wurden für den Einsatz in der Biosensorik untersucht (Seidel, 2008; Xu, 2005). Dabei wird z.B. von einem Enzym-Label wie HRP ein Substrat umgesetzt, welches ein Redox-aktives Reporter-Molekül erzeugt, das wiederum einen Elektronen-Transfer zur Elektrode auslöst (Marquette, 2006 b). Quarz-Kristall-Immunsensoren (*quartz crystal microbalance*, QCM) basieren dagegen auf einer piezo-elektrischen Detektion von Frequenzänderungen durch Bindung eines Analyten an den immobilisierten Rezeptoren und lassen sich leicht in mikrofluidische Systeme integrieren (Lee, 2005; Luo, 2006).

2.3 Der MCR 3 als Messplattform zur Durchführung Mikroarray-basierter Immunoassays

Der *Munich Chip Reader* dritter Generation (MCR 3) ist ein am IWC entwickeltes Multianalyt-Auslesesystem mit hohem Automatisierungsgrad, das die Vorteile der Immunoassay-Methodik mit moderner Durchfluss-Mikroarray-Technologie kombiniert. Dabei erfolgt die Probenzugabe analog zu Fließinjektionssystemen (FIA), die Detektionseinheit in Form einer 16-bit-CCD Kamera befindet sich über den Messzellen eines Mikroarray-Chips, der auf dem Format herkömmlicher Glasobjektträger basiert.

Der MCR 3 ist eine Messplattform zur Auslesung von Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays (CL-MIA), welche im Durchflussprinzip durchgeführt werden. Die Erzeugung des CL-Signals erfolgt durch Verwendung von HRP als Enzym-Label und eines Luminol-H₂O₂-Gemischs als CL-Substrat.

Mit Hilfe der Kombination aus Mikroarrays mit CL-Auslesung und einem mikrofluidischen System konnte am IWC in den letzten 15 Jahren eine Vielzahl an unterschiedlichen Analyten mit kompetitiven und nichtkompetitiven ELISA-Formaten auf Basis verschiedener Rezeptoren aus komplexen Matrices detektiert werden. Dabei wurde die Konstruktion der Messplattform kontinuierlich vom ersten Messgerät, dem PASA (*Parallel Affinity Sensor Array*)-System, bis hin zur aktuellen Version des MCR 3, welche kurz vor der Kommerzialisierung steht, stetig weiterentwickelt und verbessert. Mittels CL-Durchfluss-Mikroarrays konnten erfolgreich Assays zum Nachweis von organischen Wasserkontaminationen (Weller, 1999), Antibiotika-Rückständen in Milch und Honig (Knecht, 2004; Kloth, 2009 b; Wutz, 2011), Mykotoxinen aus Kaffee- und Getreide-Extrakten (Oswald, 2013; Saucedo-Friebe, 2011), Allergen-Antikörpern in Serum (Fall, 2003), pathogenen Erregern mittels DNA- (Donhauser, 2011; Lengger, 2013) bzw. Antikörper-Mikroarrays in Trinkwasserproben (Wolter, 2008; Langer, 2011) und Bioaerosolen (Langer, 2012) sowie Biotoxinen aus wässriger Matrix (Hübner, 2013; Szkola, 2013) entwickelt werden. Bei Immobilisierung kleiner Moleküle (Haptene) als Rezeptoren konnten Chips mit regenerierbarer Oberfläche etabliert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass der MCR 3 als Multiplex-Plattform für das parallele Screening von hochaffinen Antikörper-Klonen genutzt werden kann (Karsunke, 2011; Rieger, 2009).

2.3.1 Messprinzip und Aufbau des MCR 3

2.3.1.1 Mikrofluidik und Durchfluss-Mikroarray-Immunoassays

In Kapitel 2.2.3 wurde auf die Grundlagen zur Herstellung von Mikroarray-Chips und der Signalauslesung detailliert eingegangen, die Einteilung von Mikroarrays in stationäre und kontinuierliche Assays wurde dabei nur kurz erwähnt.

Seit der Etablierung von Mikroarrays mit dem Ziel der Parallelisierung und Vereinfachung von DNA- und Protein-Interaktionsexperimenten (*Lab-on-a-Chip*-Technologie) wurden Möglichkeiten getestet, den Assay an sich nach Möglichkeit kurz und automatisierbar zu gestalten, um die Attraktivität des Multiplex-Ansatzes für das Hochdurchsatz-Screening zu erhöhen. Zusammen mit der Miniaturisierung der Messsysteme können so Multiplex-Analysen mit geringen Probenmengen im μL - bis nL-Bereich durchgeführt werden (Henares, 2008).

Anstelle von konventionellen Assays im *microwell*-Format von Mikro- oder Nanotiterplatten-Assays können auch Mikrokanäle als Reaktionskammern dienen, die zum einen den Vorteil eines hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnissen mit sich bringen, zum anderen die Zugabe bzw. den Transport der Assay-Reagenzien an den Ort des Detektors mittels Anlegen eines Flusses erlauben (Henares, 2008).

Auch Mikroarray-Chips können mit fluidischen Systemen zur Assay-Durchführung kombiniert werden. Immunoassays dieser Art werden als *flow-injection immunoassays* (FIIA) bezeichnet (Gübitz, 1993). So konnten integrierte Messgeräte entwickelt werden, welche automatische Messabläufe ohne manuelle Schritte und verbunden mit reduzierten Messzeiten erlauben (Seidel, 2008; Tschmelak, 2005 b).

Der Hauptvorteil von Durchfluss-Assays liegt darin, dass die Bindungsreaktionen bei heterogenen Assays nicht mehr allein auf passiver Diffusion beruhen, sondern ein aktiver Transport (Konvektion) der Reaktionspartner zur Oberfläche durch den angelegten Fluss stattfindet und die Diffusionsgrenzschicht verringert wird. Dadurch wird der Einfluss der Massentransportlimitierung reduziert und zusammen mit dem erhöhten Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis die Bindungskinetik beschleunigt (Bange, 2005; Glaser, 1993, Kusnezow, 2006). Die quantitative Auswirkung auf die Zahl der erfolgten Antigen-Antikörper-Bindungen hängt also zum einen von der Kinetik der Bindungsreaktion ab, welche durch Gleichung 2.1 beschrieben wird, und zum anderen vom Massentransport J , welcher durch das 1. Ficksche Gesetz nach Gleichung 2.2 ausgedrückt wird (Glaser, 1993).

$$\frac{dc_{AgAk}}{dt} = k_a \cdot c_{Ag} \cdot c_{Ak} - k_d \cdot c_{AgAk} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

In Gleichung 2.1 stellt Ag das immobilisierte Antigen dar, Ak den Antikörper als freien Reaktionspartner in Lösung und k_a bzw. k_d die Bildungs- bzw. Dissoziationskonstanten des Komplexes $AgAk$.

Der Massentransport J ist von der Diffusionskonstante D , der Dicke der Diffusionsgrenzschicht δ sowie von dem Konzentrationsgefälle Δc zwischen Antikörpern an der Grenzfläche und den Antikörpern in der Flüssigkeitsschicht darüber abhängig.

$$J = -D \cdot \frac{\Delta c}{\delta} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Durch Anlegen eines Flusses kann die Diffusionsgrenzschicht verringert und somit der vertikale Massentransport der Antikörper zur Oberfläche erhöht werden. Dadurch können bei Massentransportlimitierung der Oberflächenreaktion die Inkubationszeiten im Vergleich zu stationären Assays deutlich kürzer gehalten und das Nachweisvermögen und die Sensitivität des Assays gesteigert werden (Eddowes, 1987; Glaser, 1993; Heyries, 2008). Beim Design von Mikroarray-Oberflächen ist jedoch zu berücksichtigen, dass die einzelnen Spotflächen nur einen kleinen Teil der gesamten Oberfläche der Messzelle ausmachen. Hier wirken sich höhere Flussraten aufgrund des horizontalen Massentransports in einer geringen Interaktionszeit der Reaktanden in Lösung mit den immobilisierten Rezeptoren aus, so dass anstelle einer Massentransportlimitierung eine kinetische Limitierung vorliegt und das Messsignal negativ beeinflusst wird.

Um einen Durchfluss-Assay für seinen Anwendungszweck zu optimieren, muss folglich eine geeignete Kombination der Parameter Rezeptor- und Analyt-Konzentration sowie der Flussraten bzw. Inkubationszeiten ermittelt werden, um hohe Messsignale in möglichst kurzen Assay-Zeiten erreichen zu können, z.B. auch durch *Stopped-Flow*-Ansätze (Langer, 2011). Voraussetzung ist dabei, dass ein laminarer Fluss angelegt werden kann und gleichzeitig die Scherrate so gewählt ist, dass unspezifische Anlagerungen bei den Waschrufen effektiv entfernt werden, das Abwaschen der Rezeptoren dagegen vermieden wird.

In der praktischen Umsetzung können verschiedene Methoden zur Erzeugung eines Flusses angewendet werden. Die kontinuierliche Zugabe kann durch äußeren Druck mittels Spritzenpumpen, elektrokinetisch oder durch Kapillarkräfte erfolgen (Bange, 2005; Wang, 2011). Auch die Nutzung der Zentrifugalkräfte bei rotierenden Discs ist eine Variante zur Durchführung von Fluss-Immunoassays (Ng, 2010). Die Wahl der Methode wird durch die Anforderungen an das jeweilige Messgerät in Hinsicht auf Größe, Gewicht, Kosten und gewünschte Präzision beeinflusst.

Die einfachste Art, einen Flüssigkeitsstrom zu erzeugen, ist das Anlegen eines Druckes mittels Pumpen. Dabei kann sowohl ein positiver Druck in Richtung des Messzelleneingangs ausgeübt werden wie auch ein negativer Druck durch Erzeugung eines Vakuums aus Richtung des Flusszellenausgangs. Der laminare Fluss wird durch Kanäle oder Kapillaren und unter Verwendung von Ventilen gepumpt, was aufgrund des mit abnehmendem Durchmesser steigenden Druckes zu einer Limitierung der Miniaturisierung führt (Ng, 2010).

Eine andere Methode ist die Ausnutzung elektrischer Kräfte in Form der Elektrophorese oder Elektroosmose, mit deren Hilfe geladene Moleküle ohne Verwendung von Pumpen und Ventilen in eine bestimmte Richtung gelenkt werden können (Chiem, 1998; Gao, 2005).

2.3.1.2 Aufbau des MCR 3

Zur Durchführung von Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay (CL-MIA)-Messungen wurde am IWC in Zusammenarbeit mit der Fa. GWK Präzisionstechnik (München) das Messgerät MCR 3 entwickelt. Das Gesamtkonzept des MCR 3 ist ein selbstständig operierendes Multianalyt-Detektionsgerät für die Routine-Analytik mit einem breiten Anwendungsspektrum (Kloth, 2009 a).

Das Messgerät mit seinen einzelnen Elementen ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

Im Wesentlichen besteht der MCR 3 aus acht einzelnen Elementen. Das Gerät verfügt über eine Pumpeneinheit (1), welche aus drei motorgetriebenen Spritzenpumpen besteht, mit deren Hilfe die Reagenzien und Pufferlösungen in das fluidische System abgegeben werden können. Die benötigten Lösungen werden aus den Vorratsflaschen des Reservoirs (2) aufgenommen und über ein PTFE-Schlauchsystem (Schlauchdurchmesser für die Kapillaren zur Messzelle: 0,5 mm) über den Mikroarray-Chip geleitet, der sich in der dafür vorgesehenen Schublade befindet (3). Ein Peltier-Element zur Kühlung des Chips ist in die Durchflusszelleneinheit integriert. Die CL-Signale werden mit einer 16-bit-CCD-Kamera aufgezeichnet, die sich

direkt über der Durchflusszelleneinheit befindet (4). Über die verbauten vier PTFE-Drehventile kann die Zufuhr der Reagenzien und Pufferlösungen gesteuert werden (5). Antikörperlösungen können über zwei kühlbare 50-mL-Spritzenpumpen zugeführt werden (6), die zu analysierende Probe über eine 1-mL-Einwegspritze (7). Die komplette und individuell anpassbare Ansteuerung von Ventilen, Spritzen und Kamera erfolgt mittels eines integrierten Rechners und der in Zusammenarbeit mit der Fa. ODEVIS (Burghausen) für den MCR 3 entwickelten Software *MCRVisualization* (8).

Zur Fertigung der Durchflusszelle wird die inaktivierte Mikroarray-Chipoberfläche mit einer doppelseitig klebenden PE-Folie an einen planaren Kunststoffträger (PMMA) gekoppelt, so dass die beschichtete Chipseite direkt auf dem Träger haftet (siehe Kapitel 6.2.5). Die Träger dienen zur fluidischen Anbindung des Mikroarray-Chips an das Messgerät und besitzen Einlass- bzw. Ablauföffnungen. Die Klebefolie gibt die ausgeschnittenen zwei getrennten Messkanäle mit einer Höhe von 142 μm und einem Volumen von je 43,3 μL vor.

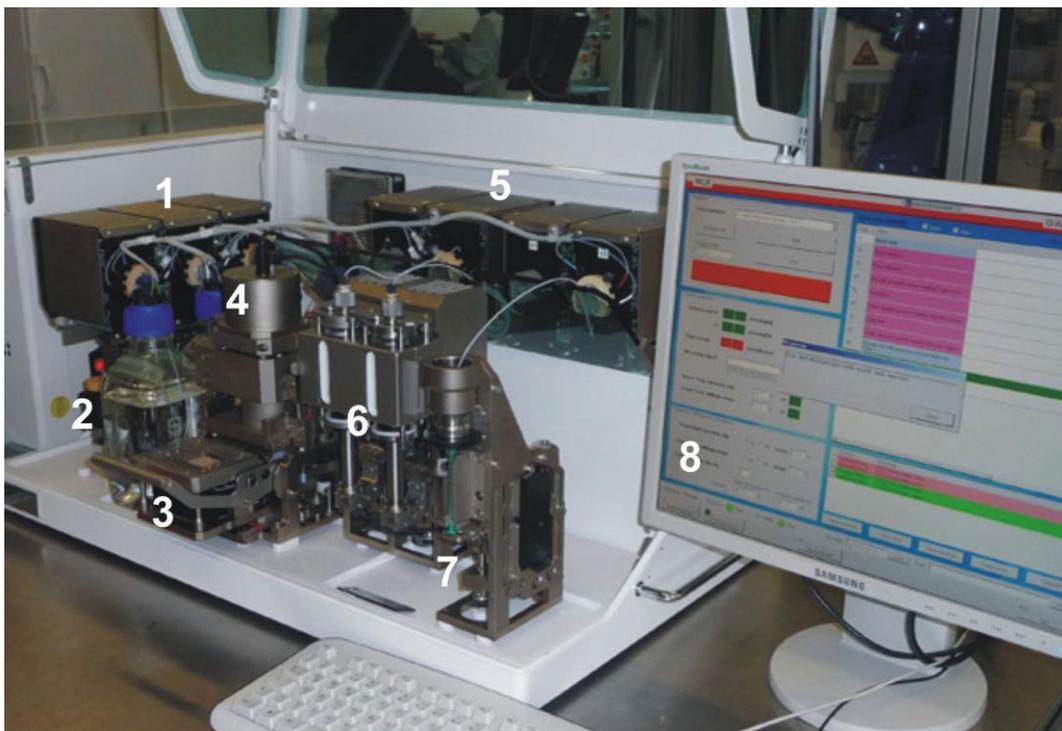


Abbildung 2.12: Aufbau des MCR 3 aus Pumpeneinheit (1), Reservoir für Pufferlösungen (2), Schublade für Durchflusszelle (3), Detektionseinheit mit CCD-Kamera (4), Ventileinheit für Reagenzienzugabe (5), Antikörperspritzen (6), Probenspritze (7), Software-gestützte Ansteuerung (8).

2.3.2 Datenauswertung der Messbilder

Die Grundlage der Datenverarbeitung sind die Bilder, die von einer CCD-Kamera während der Lichtreaktion einer CL-MIA-Messung aufgenommen und in einer Auflösung von 696 x 520 Pixel (Pixelgröße entspricht 39,3 μm) abgespeichert werden. Die generierten Bilder weisen kreisförmige Stellen mit Durchmessern von ca. 500 μm auf, die sogenannten *Spots*, bei denen die Helligkeit der Pixel höher ist als die Umgebung. Je heller die Spots sind, desto höher war die Ausbeute der Lichtreaktion. Die maximale Helligkeit eines Pixels entspricht bei der verwendeten 16-bit-Kamera 65.535 Graustufen (a.u.), die minimale Helligkeit des Hintergrunds beträgt ca. 1.300 a.u..

Ein Spot setzt sich aus einer dreistelligen Zahl an einzelnen Bildpunkten zusammen, wobei innerhalb eines Spots der Helligkeitsverlauf der Pixel idealerweise einer Gauß-Verteilung entspricht.

Die erste Problemstellung bei der Auswertung der Messbilder liegt in der Erkennung der Spots. Hierzu wurde ein Raster entworfen, das über das Array-Muster des Mikroarray-Chips gelegt werden kann (siehe Abbildung 2.13).

Das Raster setzt sich dementsprechend aus quadratischen Messzellen zusammen, die in ihrem Aufbau analog zu den Reihen und Spalten an Spots sind. Die Messzellengröße des Rasters ist variabel einstellbar, der Standardwert wurde auf 25 x 25 Pixel eingestellt.

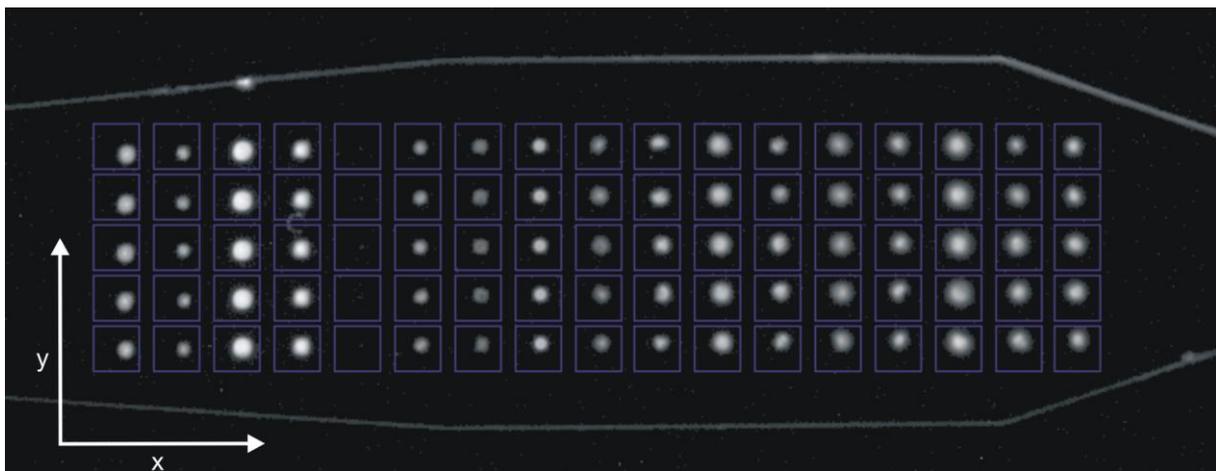


Abbildung 2.13: Raster zur Verarbeitung der Rohdaten (x = Analyt, y = Replikate).

Die Datenauswertung für einen einzelnen Spot erfolgt durch Mittelwertbildung der jeweils zehn hellsten Pixel innerhalb einer Messzelle, wobei ein Algorithmus selten auftretende, in ihrer Intensität stark abweichende Pixel (Fehlpixel) aus der Berechnung herausnimmt. Die Wahl der zehn hellsten Bildpunkte als Berechnungsgrundlage wurde getroffen, da neben statistischen Streuungen auch Helligkeitsschwankungen innerhalb eines Spots auftreten können, die auf eine ungleichmäßige Belegung mit Rezeptormolekülen zurückzuführen sind. Dieser Einfluss auf das Messergebnis soll durch den gleichbleibenden Bezug auf die hellsten Pixel im Vergleich zur Berücksichtigung aller Pixel minimiert werden. Bei vergleichender Analyse der Auswertemethoden konnte bestätigt werden, dass der Bezug auf die hellsten Pixel zu geringeren Streuungen führt als die Integration über alle Pixel eines Spots (Wutz, 2011).

Die verschiedenen zu untersuchenden Analyten sind in mehreren Replikaten immobilisiert. Jeder Spot stellt dabei ein unabhängiges Messergebnis dar. Aus der Redundanz lässt sich eine mittlere Helligkeit der Replikate eines Analyten bei der aufgenommenen Messung berechnen. Im Idealfall erfolgt die Berechnung durch einfache Mittelwertbildung der einzelnen CL-Werte aller Replikat-Spots. Bei den realen Messungen kann jedoch der Fall auftreten, dass einzelne Spots nur eine schwache oder gar keine Helligkeit besitzen. Der Grund hierfür liegt entweder in Fehlern bei der Fertigung der Mikroarray-Chips oder in einer Luftblasenbildung in der Messzelle. Beide Fehlerquellen sind extern, d.h. nicht auf die CL-Reaktion an sich zurückzuführen und sollten daher nicht im Rahmen der natürlichen Streuung von Messergebnissen berücksichtigt werden. Um solche Ausreißer effektiv zu erkennen und diese automatisch aus der Mittelwertberechnung herauszunehmen, wurde ein einfacher Algorithmus implementiert, der auf einer Bewertung der relativen Standardabweichung der Replikate beruht. Zunächst werden alle CL-Signalwerte der einzelnen Spots eines Analyten gemittelt und die absolute Standardabweichung s bestimmt. Durch Bezug auf den Mittelwert resultiert die relative Standardabweichung s_{rel} [%]. Der Betrag der relativen Standardabweichung wird nun in Relation zu einem frei wählbaren Toleranzwert [%] gesetzt. Liegt die relative Standardabweichung der Replikate im Rahmen dieser Toleranz, werden alle Spots bei der Auswertung berücksichtigt. Wird die Toleranzgrenze hingegen überschritten, ist dies auf eine große Streuung der Signalwerte zurückzuführen und deutet auf ein Vorhandensein eines Ausreißers hin. In diesem Fall muss der Algorithmus erkennen, welcher Spot für die große Standardabweichung verantwortlich ist. Dafür wurde ein

Berechnungsverfahren entwickelt, das sich auf die kombinatorische Analyse der Spots stützt (Wutz, 2011). Dabei werden aus den n Messwerten, d.h. den einzelnen Spots pro Analyt, alle möglichen Kombinationen k aus $n-1$ Messwerten gebildet. Diejenigen Kombinationen, welche den Ausreißer beinhalten, sollten über dem Toleranzwert liegen, wohingegen die Kombination, die den Ausreißer nicht enthält, eine deutlich unter dem Toleranzwert liegende relative Standardabweichung besitzt und somit für die Auswertung herangezogen wird. Auch für den seltenen Fall, dass innerhalb einer Spalte zwei der fünf Replikate aufgrund von Blasenbildung ignoriert werden sollten, ist der Algorithmus ausgelegt. Die Berücksichtigung von drei Spots pro Analyt wurde als minimale Wiederholeinheit für ein statistisch abgesichertes Messergebnis definiert.

Bei diesem Verfahren zur Erkennung von Ausreißern muss berücksichtigt werden, dass die Toleranzgrenze so gewählt werden sollte, dass zwischen der statistischen Streubreite der Signalwerte, welche über die Einführung mehrerer Replikate pro Analyt in Form der Angabe einer Standardabweichung gewünscht ist, und den nicht statistischen Abweichungen unterschieden werden kann. Die relative Standardabweichung dient als Bewertungsgrundlage für die Homogenität der CL-Signale und damit für die Qualität des Mikroarray-Chips und des Durchfluss-Assays. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Toleranzgrenze auf 15 % eingestellt. Diese wurde nach Optimierung von Oberflächenchemie und Messablauf nur bei eindeutig durch Blasenbildung gestörten Messbildern überschritten.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Voruntersuchungen zur Assay-Entwicklung für den Nachweis von HEV-Antikörpern in Schweineseren mittels Antigen-basierter Immuno-chips

Für die Etablierung eines Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays (CL-MIA) für den Nachweis von Antikörpern gegen zoonotische Pathogene in Schweineseren am MCR 3 mussten zunächst einige grundlegende Voraussetzungen erfüllt werden.

Hier stand zu Beginn die Entwicklung eines geeigneten Messprogrammes am MCR 3 im Vordergrund, mit welchem erste Experimente mit Realseren durchgeführt werden konnten.

Ein ebenfalls sehr wichtiges Kriterium für einen erfolgreichen Immuno-chip war das Verhalten bzw. die Stabilität der rekombinanten Antigene (rAgs) während und nach der Immobilisierung mittels Kontaktdruck-Verfahren. Da zum ersten Mal in den Mikroarray-Projekten am IWC rekombinante Antigene verwendet wurden, lagen hierzu keine Erfahrungswerte vor, so dass die Eignung dieser Rezeptoren für die Mikroarray-Technologie grundsätzlich getestet werden musste.

Für die Projektplanung war es wichtig, die Messstrategie für die hergestellten Antigen-Mikroarrays zu definieren. Hierzu wurde das Regenerationsverhalten der rekombinanten Antigene getestet, um die Möglichkeit eines wiederverwendbaren Mikroarray-Chips zu prüfen. Für diese Voruntersuchungen wurden Antigene des Kooperationspartners Mikrogen verwendet, die in kommerziellen stationären Testplattformen bereits zu Einsatz kommen. Am Beispiel des Nachweises von anti-HEV IgG wurden hier für die ersten Tests im Mikroarray-Format die rekombinanten HEV-Antigene der ORF2-Region des Genotyps 3 (O2C-gt3) und der ORF3-Region dieses Genotyps (O3-gt3) immobilisiert, im späteren Verlauf wurde auch das Antigen O2C-gt1 eingesetzt. Als Immobilisierungsstrategie wurde die kovalente Kopplung der Proteine über freie Aminogruppen an Epoxy-PEG-aktivierte Glasoberflächen gewählt.

Neben diesen elementaren Untersuchungen zur Entwicklung einer Immuno-chip-Methode wurden im späteren Projektverlauf Tests zur Lagerfähigkeit der rAg-Mikroarrays durchgeführt. Hierfür wurden optimierte, mit den HEV-Antigenen O2C-gt1 und O2C-gt3 belegte Chips verwendet. Diese Tests basieren somit auf Chips, welche nach den Erkenntnissen der in Kapitel 3.2 beschriebenen Experimente hergestellt wurden. Da für eine umfassende Beurteilung der Lagerstabilität der Mikroarray-Chips noch zu wenige Daten vorliegen, werden die bereits durchgeführten Tests in diesem Kapitel als Voruntersuchungen diskutiert.

3.1.1 Entwicklung eines geeigneten Messprogramms am MCR 3

3.1.1.1 Assay-Prinzip und Setup des MCR 3

Für den Nachweis von Antikörpern in Serum mittels Immunoassay mussten die benötigten Assay-Schritte im Durchflussprinzip auf der Ausleseplattform MCR 3 definiert werden.

Die Assay-Schritte bestanden dabei in der Inkubation des Antigen-Mikroarrays mit den Serumproben und der anschließenden Zugabe des Detektionsantikörpers. Die Auslesung der Signale erfolgte mittels Zugabe der Chemilumineszenz (CL)-Substrate Luminol und Wasserstoffperoxid. Eine schematische Übersicht der einzelnen Teilschritte dieses nichtkompetitiven, indirekten Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays (CL-MIA) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

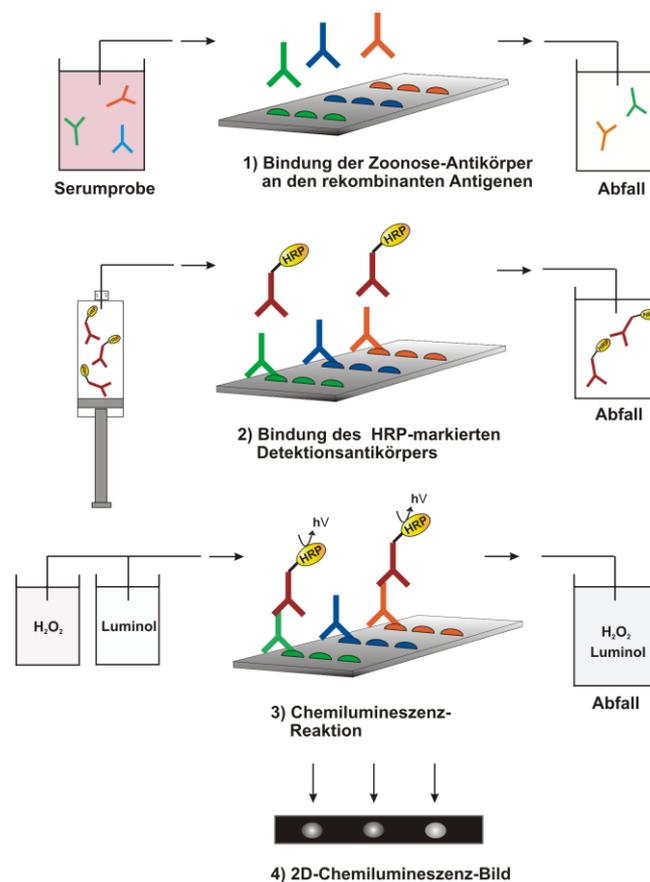


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Assay-Prinzips zum Nachweis von Antikörpern gegen zoonotische Pathogene mittels Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay (CL-MIA) am MCR 3. Bei der vereinfachten Darstellung ist zu beachten, dass der Mikroarray-Träger die obere Seite des Durchfluss-Chips darstellt.

Der Nachweis der gebundenen Serumantikörper an den Antigenen erfolgt durch Zugabe eines Spezies-spezifischen Detektionsantikörpers, der den F_c-Teil der Pathogen-spezifischen Zielantikörper erkennt. Das verwendete Ziege anti-Schwein IgG-HRP-Konjugat markiert alle am Chip gebundenen IgG-Antikörper aus dem Schweineserum. Es werden somit keine spezifischen Primärantikörper eingesetzt, sondern die Spezifität des Assays ergibt sich aus der Verwendung geeigneter Antigene als Rezeptor-Liganden auf der Oberfläche.

Die Reagenzienzugabe erfolgt am MCR 3 über motorgetriebene Spritzenpumpen und ein Kapillarsystem mit Ventileinheiten (Kloth, 2009 a). Für den Nachweis von Serumantikörpern wurde dabei das in Abbildung 3.2 skizzierte Setup gewählt.

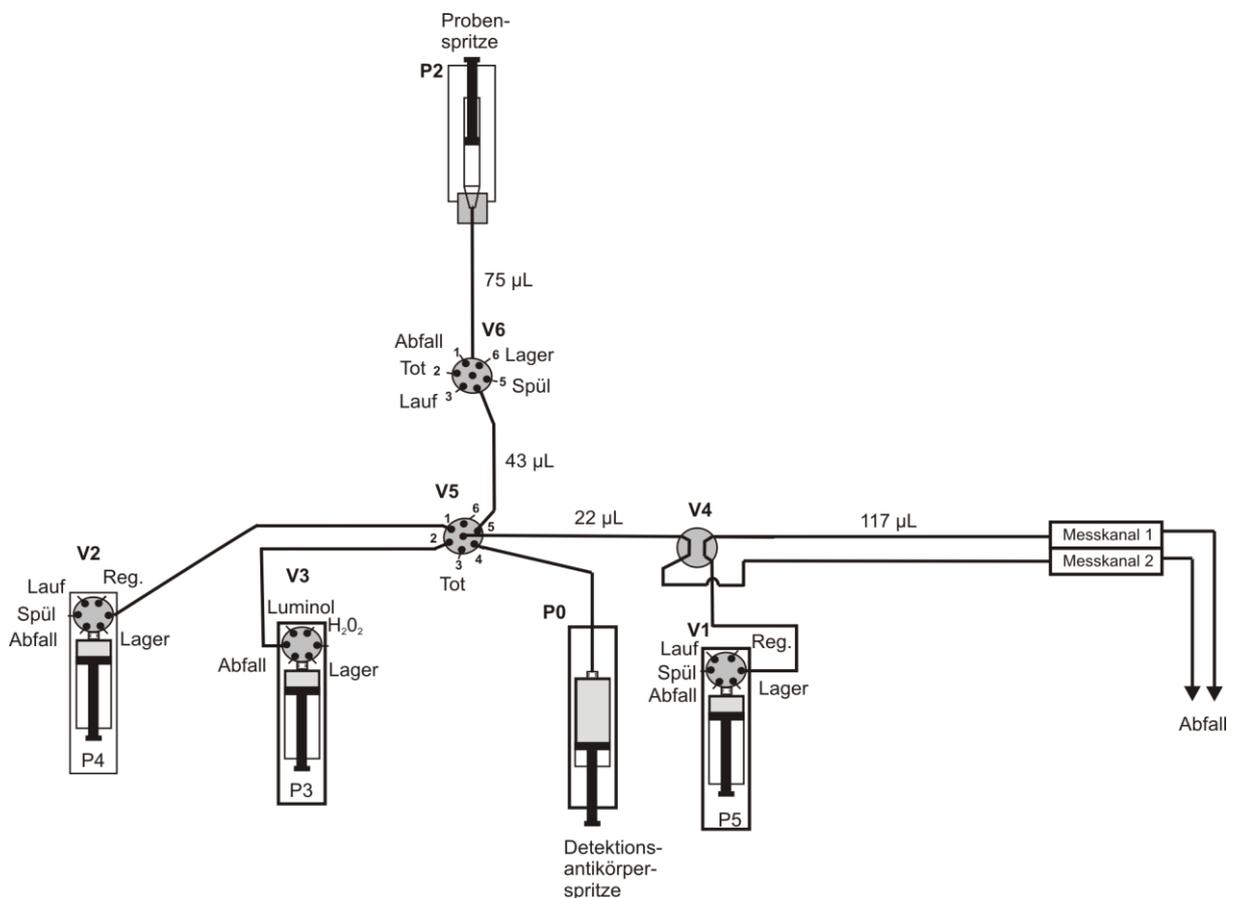


Abbildung 3.2: Fluidikplan inklusive Kapillarvolumina des MCR 3 für den Nachweis von Serumantikörpern.

Hierbei wurde im ersten Schritt die Probe über die Probenspritze P2 injiziert und über die Ventile V6, V5 und V4 zur Chipoberfläche geleitet. Nach einem Waschschrift konnte dann der Detektionsantikörper aus Pumpe P0 über die Ventile V5 und V4 zugegeben werden. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Chemilumineszenzreaktion durch die Zugabe der

Substrate Luminol und Wasserstoffperoxid aus Pumpe P3 gestartet und die Emission der Photonen mit Hilfe der Kameraeinheit in Form von 2D-Bildern des Mikroarray-Chips aufgezeichnet. Die Waschschriffe wurden über die Spritzenpumpe P5 und Ventil V2 durchgeführt.

Damit wurden für die Assay-Durchführung nicht alle verfügbaren Spritzen und Ventile des für die Milchanalytik entwickelten Messgeräts verwendet. Diese bieten jedoch die Option, für eine Erweiterung des Assays genutzt zu werden. Zum einen kann analog zum Antibiotika-Mikroarray die Regenerierbarkeit des Chips getestet werden, indem Regenerationspuffer aus P4 über den Chip gegeben werden kann, zum anderen kann die für die Durchführung des Assays nicht benötigte Pumpe P1 bei Nutzung von Ventil V7 dafür verwendet werden, eine Serumprobe nicht nur auf eine Antikörperklasse zu untersuchen, sondern darüber hinaus durch Verwendung eines zweiten Detektionsantikörpers und Inkubation der zweiten Messzelle des Chips eine weitere Antikörperklasse wie z.B. IgM nachzuweisen.

3.1.1.2 Verwendete Reagenzien und Puffer

Für die Etablierung des CL-MIAs galt es, ein analytisch verwertbares Messsignal bzw. ein zufriedenstellendes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (SNR) des Assays zu erzielen. Das Messsignal wird zum einen durch die Inkubationsbedingungen beeinflusst, zum anderen spielen die Reagenzienkonzentrationen und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer eine wichtige Rolle für das resultierende spezifische und unspezifische Signal des Durchfluss-CL-MIAs.

Generell sollte ein Durchfluss-Assay eine deutlich schnellere Analyse erlauben als ein vergleichbarer stationärer Assay, um den Vorteil eines zeitnahen Befundes zu gewährleisten. Im Fall des zu etablierenden Nachweises von anti-HEV IgG beträgt die Assay-Zeit des kommerziellen ELISA-Kits PrioCheck® HEV porcine (Prionics) inklusive manueller Schritte ca. zweieinhalb Stunden, für die Durchführung des *Line Immunoassay*-(LIA)-Tests *recomLine* HEV IgG/IgM (Mikrogen) werden ca. drei Stunden benötigt. Im Unterschied zum Mikroarray-Format können mit stationären Methoden allerdings in der Regel eine Vielzahl an Proben parallel untersucht werden, während mittels CL-MIA die Proben konsekutiv abgearbeitet werden. Daher sollte der Chip-basierte Assay in deutlich kürzerer Zeit durchgeführt werden können und gleichzeitig aufgrund seiner Multiplex-Fähigkeit seine Vorteile als alternative Nachweismethode aufzeigen.

Für die Analyse von Serumproben ist generell zu berücksichtigen, dass mit jeder instrumentellen Analysenmethode Matrixprobleme auftreten können. Für Immunoassays ist hier mit einem erhöhten unspezifischen Signalhintergrund zu rechnen, der durch den hohen Proteingehalt (ca. 6 - 7 %) des Serums verursacht wird. Dieser setzt sich bei Wirbeltieren zu großen Teilen aus Albuminen und Globulinen zusammen. Diese Proteine können sich an der Oberfläche absetzen, darunter auch die im Serum enthaltenen unspezifischen IgGs. Für humane IgG-Antikörper ist bekannt, dass diese dazu neigen, sich auf Trägeroberflächen anzulagern (Anderson, 1998). Gleichzeitig können Inhibitionseffekte durch Matrixbestandteile eine negative Auswirkung auf das spezifische Signal haben (Moreno-Bondi, 2005). Deshalb werden Serumproben in der Regel deutlich ($\geq 1:50$) mit Puffermatrix verdünnt, um einen sensitiven Nachweis der Zielanalyten zu ermöglichen. Je höher allerdings der gewählte Verdünnungsfaktor, desto weniger Analytmoleküle liegen in der Probe vor, was den Nachweis erschwert. Um diesen Verdünnungseffekt zu kompensieren und höhere Signale zu erzielen, können wiederum die Assaybedingungen bei der Zugabe der Reagenzien angepasst werden. So kann das Probenvolumen erhöht werden oder aber der Interaktionszeitraum der Probe mit den Rezeptoren. Die Erhöhung der Inkubationszeit kann sich jedoch auch in einer gleichzeitigen Verstärkung unspezifischer Bindungen auswirken. Eine andere Möglichkeit, das Messsignal zu verbessern, bietet sich in der Erhöhung der Konzentration des Detektionsantikörpers mit den gleichen unerwünschten Risiken. Bei der Assay-Entwicklung muss also eine geeignete Kombination aus Reagenzienkonzentrationen, Verdünnungsmatrices und Inkubationszeiten gefunden werden. Da dies häufig mit einem sehr großen experimentellen Aufwand verbunden ist, der sich aufgrund des parallelisierbaren Designs für Mikrotiterplatten-Assays sehr viel einfacher umsetzen lässt, wurden für die Entwicklung des CL-MIAs gewisse Rahmenbedingungen festgesetzt, die bei der Optimierung des Assays nicht verändert wurden. Dabei wurde auch auf Erfahrungswerte aus der Entwicklung der Assays zum Nachweis von Antibiotika in Honig- und Milchproben (Kloth, 2009 b; Wutz, 2011) und von Mykotoxinen in Getreideproben (Oswald, 2013) im Rahmen von Forschungsprojekten am Lehrstuhl zurückgegriffen. So wurden z.B. die Mengen und Zugabegeschwindigkeiten für die CL-Substrate sowie die Geschwindigkeit der Waschschrte aus den etablierten Assay-Protokollen übernommen.

Einen Nachteil gegenüber stationären Systemen bringt der Durchfluss-Assay für das Arbeiten mit proteinhaltigen Flüssigkeiten mit sich. Da Proteine in Lösung zum Schäumen neigen (Kitabatake, 1982), kann dies im Flusssystem zu einer Blasenbildung führen, welche über die

Kapillarschläuche zur Messzelle gelangen und sich dort negativ auf die Messung auswirken können. Treten Blasen in die Messzelle ein, so können diese nur bei hohen Flussraten ($\geq 50 \mu\text{L/s}$) wieder aus der Zelle gespült werden. Für stationäre Immunoassays haben sich jedoch Proteinlösungen für die Probenverdünnung als sehr effektiv erwiesen, um unspezifische Signale zu reduzieren. Sehr häufig werden die Pufferlösungen daher mit Additiven wie Casein, BSA (bovines Serumalbumin) oder Milchpulver versetzt (Jeyachandran, 2010).

Wie der Abbildung 3.2 zu entnehmen ist, wird für die Probenzugabe am verwendeten Messgerät eine Probenspritze verwendet. Diese wird in ihre Vorrichtung eingelegt und ihr Inhalt automatisch in das Schlauchsystem eingegeben. Die Befüllung dieser herkömmlichen 1 mL-PE-Einmalspritze erfolgt jedoch manuell. Hier zeigte sich in den Vorversuchen, dass schon beim Befüllen der Spritze von Serumproben in unterschiedlichen proteinhaltigen Verdünnungspuffern (PBS mit Casein- bzw. BSA-Zusatz) Blasen an den Wänden entstanden, die sich nur schwer vermeiden ließen. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der fluidischen Anbindung der Einmalspritze an das Kapillarsystem. Hier muss die Dichtigkeit der Verbindung gewährleistet werden, um neben der verlustfreien Zugabe der Probe das Eindringen von Luft bei Unterdruckbedingungen, wie sie beim Wiederbefüllen der Spritze auftreten, zu vermeiden. In Testversuchen musste allerdings festgestellt werden, dass eine vollständige Gasdichtheit nicht gegeben war. Im Fall der Serummatrix führte dies zu einer stärkeren Blasenbildung als dies bei der Anwendung mit Milch als Matrix festgestellt worden war. Die Anbindung der Probenspritze wurde am MCR 3 konstruktiv mittels Federspannung bei Einführung der Spritze umgesetzt. Dabei wird die konische Spitze leicht komprimiert, was zum Eindringen von Luft führen kann und die Blasenbildung fördert. Erst im späteren Verlauf des Projektes konnte das Setup des Geräts für den Einsatz einer alternativen Einmalspritze (Omnifix-F, Braun) adaptiert werden, welche aufgrund ihrer PS-Körpers und ihrer größeren Wandstärke im Konus weniger Kompressibilität zeigte und damit die Problematik verringerte. Zukünftig wäre hier die Verwendung eines Probensamplers mittels Nadelinjektion, wie es für die Probenaufgabe bei HPLC-Systemen Standard ist, eine sinnvolle Alternative. Dies würde auch das manuelle Befüllen der Probenspritze überflüssig machen und damit die Luftblasenproblematik vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen diesem Problem Rechnung getragen, indem ein Teil der Probe nicht für die Messung verwendet, sondern über Ventil V6 direkt in den Abfall gegeben wurde. Da bei dem bestehenden Setup des MCR 3 die Probenspritze auch für

Spülschritte der Schläuche verwendet werden muss, wurden die Aufziehggeschwindigkeiten soweit angepasst, dass möglichst wenig Unterdruck und damit möglichst wenig Luftblasen entstanden.

Sowohl für die Verdünnungsmatrix der Probe als auch für die Wahl des Laufmittels, mit welchem auch die Wasch- und Spülschritte durchgeführt werden, war die Blasenbildung ein wichtiger Aspekt. Für die Assays am MCR 3 war in den bisherigen Arbeiten stets Casein als Zusatz im Laufmittel PBS eingesetzt worden. Da im Vergleich zu stationären Systemen am MCR 3 große Mengen an Puffer nötig sind, stellt Casein als *Blocking*-Reagenz eine kostengünstige und effektive Variante zu BSA dar. Für die Serumanalytik wurde aufgrund der geschilderten Problematik mit Proteinlösungen stattdessen das Polysorbat Tween-20 getestet, welches wegen seiner Eigenschaft als Detergens in Immunoassays standardmäßig zur Reduzierung unspezifischer bzw. niederaffiner Interaktionen der Probenlösung mit der Oberfläche in Waschpuffern eingesetzt wird. Im Gegensatz zur Wirkung von Proteinen wird also weniger die Oberfläche selbst geblockt, sondern die Wechselwirkungen mit der Oberfläche unterbunden. Dies setzt umgekehrt wiederum voraus, dass die Oberfläche des Mikroarray-Chips bereits im Vorhinein effektiv gegen unspezifische Anbindungen vorbehandelt wird. Die Optimierung der Chipoberflächen wird in Kapitel 3.2.2.3 diskutiert. Darüber hinaus ist auch eine Adsorption des Polysorbates an die Chipoberfläche und eine damit einhergehende protektive Wirkung von Tween-20 gegenüber ungerichteter Proteinadsorption denkbar (Shen, 2011; Steinitz, 2000). Der Einsatz von Tween-20 im Laufmittel konnte im Rahmen der Arbeiten zur Entwicklung eines Glyco-Chips für den Nachweis von Ricin im Hinblick auf die resultierenden Hintergrundsignale positiv bewertet werden (Hübner, 2013). Der Einsatz von Tween-20 im Laufpuffer hat zudem den positiven praktischen Nebeneffekt, dass Tween-haltige Laufmittel nicht das Problem von Proteinablagerungen im fluidischen System mit sich bringen und somit die Gefahr von Verstopfungen von Ventilen und Schläuchen, wie sie mit Casein aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit von Zeit zu Zeit auftraten, nicht länger existiert.

Da der Einsatz von Tween-20 in einer Konzentration von 0,05 % (v/v) in PBS (pH 7,6) zu einer geringeren Blasenbildung im Vergleich zu einer 0,5 %-igen Casein-Lösung in PBS führte, wurde dieser PBST-Puffer auch für die Verdünnung der Serumproben und des Detektionsantikörpers verwendet.

Für die Einstellung der Verdünnungsstufe der Serumproben dienten die Protokolle der Assays des Projektpartners Mikrogen als Anhaltspunkt. In diesen werden die Seren einheitlich mit

Verdünnungspuffern 1+100 verdünnt (entspricht einer 1:101-Verdünnung). Um den zu etablierenden CL-MIA-Test später mit den bestehenden Testsystemen hinsichtlich seiner Nachweisstärke vergleichen zu können, war es somit sinnvoll, die Proben auch für die Messungen am MCR 3 in dieser Verdünnung zu testen. Da für die Probenzugabe eine 1 mL-Einmalspritze verwendet wurde, war das Probenvolumen auf 1.000 μL limitiert. Es wurden somit ca. 10 μL reine Serumprobe pro Analyse eingesetzt.

Bei der Konzentration des Detektionsantikörpers wurde diese geringe Probenmenge berücksichtigt, indem - im Vergleich zu stationären Assays - sehr hohe Konzentrationen zwischen 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (entspricht einer 1:250-Verdünnung) und 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1:1.000-Verdünnung) des Ziege anti-Schwein IgG-HRP-Konjugats (KPL) getestet wurden. Der optimierte Assay wurde dann mit einer Antikörper-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt. Generell sind für die am MCR 3 entwickelten Assays deutlich höhere Marker-Konzentrationen als bei stationären Assays nötig, um auch bei kontinuierlicher Zugabe hinreichend Signal zu erzeugen. Da der verwendete Detektionsantikörper jedoch sehr preisgünstig ist, liegen die Kosten hierfür pro Analyse dennoch lediglich im Bereich von 0,10 €.

3.1.1.3 Assay-Durchführung und Experimente zur Optimierung der Inkubationsbedingungen

Für die Etablierung eines Durchfluss-Assays bietet die Software *MCR Visualization* die Möglichkeit, die Reagenzien und Substrate in individuell programmierbarer Befehlsreihenfolge über die Messzellen des Mikroarray-Durchfluss-Chips zu leiten. Für den Ablauf der Assay-Schritte sind dabei auch die in Abbildung 3.2 angegebenen jeweiligen Totvolumina der genutzten Kapillarschläuche zu berücksichtigen. Wichtig für die Gestaltung des Messprogramms sind neben den Volumina der einzelnen Kapillaren zudem die minimalen und maximalen Flussraten, welche mit den verwendeten Spritzenpumpen erreicht werden können, da diese die Variationsmöglichkeiten bei der Inkubation des Mikroarrays mit den Reagenzien definieren. Dabei können mit dem bestehenden Setup für P2 maximale Füll- und Abgabegeschwindigkeiten zwischen 10 $\mu\text{L}/\text{s}$ und 250 $\mu\text{L}/\text{s}$ gewählt werden, für P0 kann die Abgabe im Bereich zwischen 10 $\mu\text{L}/\text{s}$ und 100 $\mu\text{L}/\text{s}$ eingestellt werden.

Für den Weg der Probe ergibt sich ein Totvolumen von über 250 μL , das durchlaufen werden muss, bevor die Probe in die Flusszelle mit einem Volumen von ca. 43 μL gelangt. Erst bei einer Abgabe von fast 300 μL aus P2 ist also die Messzelle vollständig mit der Probenlösung

gefüllt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass sich auch nach vollständiger Probenzugabe aus P2 noch 250 μL der Probe im Schlauchsystem befinden. Um die Probe komplett über den Chip zu leiten, ist es somit nötig, das restliche Volumen mit Laufmittel über den Chip zu schieben. Dazu kann die Probenspritze P2 nach Zugabe des Serums mit Laufmittel befüllt und dieses in Richtung Chip abgegeben werden.

Der erste Assay-Schritt der Probenzugabe wurde somit in drei Abschnitte untergliedert. Zunächst wurden 100 μL der Probe direkt in den Abfall gegeben, um entstandene Luftblasen nicht auf die Flusszelle zu schieben. Anschließend wurden 200 μL der Probe mit der maximalen Flussrate von 250 $\mu\text{L/s}$ Richtung Chip geleitet, um das Totvolumen zu überbrücken. Die übrigen 700 μL der Serumprobe wurden dann mit der gewünschten Assay-Geschwindigkeit bzw. in Intervallen über den Chip gegeben. Um die in den Schläuchen verbliebene Probenmenge für die Messung nutzen zu können, wurde im dritten Schritt die Probenspritze mit Laufmittel wiederbefüllt und dieses mit derselben Flussrate über den Chip geleitet. Anschließend erfolgte der Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Probenbestandteile von der Chipoberfläche aus P5 (2.000 μL mit 500 $\mu\text{L/s}$).

Für die Zugabe des Detektionsantikörpers wurde in ähnlicher Weise verfahren. Hier wurden zunächst mit 200 μL der Antikörperlösung die Schläuche bis zur Flusszelle aus P0 mit der maximalen Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{L/s}$ befüllt, anschließend wurden 800 μL mit der minimalen Abgabegeschwindigkeit von 10 $\mu\text{L/s}$ in Richtung Chip gegeben.

Während der Zugabe des Detektionsantikörpers wurde die Probenspritze mehrfach mit Laufpuffer gefüllt und damit die Spritze und das Schlauchstück zu Ventil 6 gründlich gespült, um Serumrückstände zu entfernen.

Nach einem weiteren Waschschrift des Chips aus P5 erfolgte die Zugabe der Chemilumineszenz-Substrate. Diese waren während der vorherigen Assay-Schritte in 50- μL -Volumenelementen abwechselnd in Pumpe P3 aufgezogen worden, um eine gute Durchmischung der beiden Substrate zu gewährleisten. Insgesamt 400 μL dieses Gemisches wurden mit 150 $\mu\text{L/s}$ über den Chip gegeben, um ein Signal mit den gebundenen HRP-markierten Detektionsantikörpern zu erzeugen. Die bei der Enzym-katalysierten Reaktion emittierten Photonen wurden mit Hilfe des CCD-Chips der Kamera über 60 s akkumuliert und in Form eines orts aufgelösten Messbildes gespeichert. Während der Reaktion wurde das Ventil 4, über welches die für die Messung verwendete Flusszelle eingestellt wird, auf die für die aktuelle Messung nicht genutzte Flusszelle umgestellt, um zu verhindern, dass während

der Signalaufzeichnung durch evtl. nachströmende Flüssigkeit die Spot-Signale beeinflusst werden.

Im Anschluss an die Messung wurden alle Schläuche mit Laufmittel aus P2 bzw. P5 gründlich gespült, um Verschleppungseffekte für die nächsten Messungen auszuschließen. Die Effektivität der Spülschritte wurde im späteren Projektverlauf überprüft, indem nach einer Probenmessung bei einer anschließenden Messung statt Probe nur Laufpuffer injiziert wurde, wobei kein Signal messbar sein sollte. Dies konnte für das optimierte Messprogramm bestätigt werden.

Bis auf die Inkubationsbedingungen bei der Probenzugabe wurden mit diesem beschriebenen Messprogramm die wichtigen Assay-Schritte definiert. Aufgrund des vorgegebenen Setups bot sich hierfür entweder die Option einer kontinuierlichen Zugabe mit einer minimalen Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ oder eine Zugabe in Intervallen, wodurch die Interaktionszeit der Serumantikörper mit den immobilisierten Antigenen beliebig verlängert werden kann. Für den zu bildenden Antigen-Antikörper-Komplex wird über die Einstellung der Flussrate und der Inkubationszeit das Verhältnis zwischen passiver Eigendiffusion der Antikörper zur Oberfläche bei stationären Bedingungen und aktiver Konvektion der Antikörper bei Anlegen eines Flusses geregelt und damit die Bindungswahrscheinlichkeit beeinflusst (Eddowes, 1987). Durch ein laminares Strömungsprofil kann die Massentransportlimitierung durch Reduzierung der Grenzschicht verringert werden, allerdings können zu hohe Flussraten im Widerspruch zur Kinetik der Komplexbildung stehen, welche durch die vorliegenden Assoziations- und Dissoziationskonstanten bestimmt wird (Glaser, 1993).

In den Arbeiten mit CL-MIA-Methoden am IWC wurde generell festgestellt, dass bezogen auf eine kontinuierliche Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ eine signifikante Erhöhung der Geschwindigkeit bei der Probenzugabe eine sehr deutliche Signalabnahme zur Folge hat. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktionszeiträume auf den Spotflächen, die nur einen sehr kleinen Anteil der gesamten Messzellenoberfläche ausmachen, bei höheren Strömungen zu gering für eine quantitative Bindung des Analyten werden.

Da die in den Vorversuchen ermittelten Signale für die HEV-Antigene bei Inkubation mit den zur Verfügung stehenden Serumproben unter Verwendung einer kontinuierlichen Flussrate von 10 μL (Assay 1) sehr gering waren, wurden auch Programme mit *Stopped-Flow*-Assays getestet. Hier wurde z.B. die Zugabe der Probe in 50- μL -Einheiten unterteilt, die mit 50 $\mu\text{L/s}$ auf den Chip gebracht wurden. Jedes Volumenelement wurde für 30 s inkubiert, so dass

insgesamt eine wesentlich höhere Interaktionszeit von 540 s im Vergleich zu den 90 s bei kontinuierlicher Zugabe resultierte. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich zwar das Signal auf den Spotflächen um ca. Faktor 1,6 erhöhte, gleichzeitig jedoch der Signalhintergrund auf der umgebenden Chipoberfläche um fast denselben Faktor anstieg, so dass kein besseres SNR erzielt werden konnte.

Ein anderer Einflussfaktor auf die Signalentwicklung des Assays ist die Temperatur, die sich besonders bei der Enzym-katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion auf den Substratumsatz auswirken sollte. Um diesen Einfluss zu testen, wurde eine Versuchsreihe an einer MCR 3-Plattform durchgeführt, bei welcher im Rahmen des BMBF-Projektes PATH₂OGENSCAN eine beheizbare Flusszelleneinheit implementiert worden war und gleichzeitig eine minimale Abgabegeschwindigkeit der Probe mit nur 0,5 µL/s realisiert werden konnte.

Für diese Versuche wurde als Probe das Serum H 12, welches in den Tests mit der *Line Immunoassay* (LIA)-Referenzmethode *recomLine HEV IgG/IgM* (Mikrogen) als seropositiv bezüglich anti-HEV IgG beurteilt werden konnte, verwendet. Das Serum wurde in einer 1+9-Verdünnung und der angestrebten 1+100-Verdünnung eingesetzt.

Es wurden drei bzw. vier verschiedene Varianten des Assay-Designs getestet, welche die Einflüsse von Interaktionszeit und Temperatur aufzeigen sollten.

Dabei wurde der oben beschriebene Assay 1 mit Zugabe von Probe und Detektionsantikörper mit jeweils 10 µL/s nicht bei Raumtemperatur durchgeführt, sondern alle Assay-Schritte fanden bei 40 °C statt (Assay 2). Darüber hinaus wurden zwei *Stopped-Flow*-Assays bei 40 °C getestet, bei denen die Probe kontinuierlich mit 10 µL/s (Assay 3) bzw. 0,5 µL/s (Assay 4) zugegeben wurde, der Detektionsantikörper in Volumenelementen von 20 µL mit jeweils 5 s Pause.

Die Signale, die mit diesen verschiedenen Bedingungen erzielt werden konnten, sind in Abbildung 3.3 gezeigt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 40 °C eine Steigerung der Signale mit sich bringt. Für den Positivkontrollantikörper Ziege anti-Schwein IgG, welcher mit allen IgGs in der Serumprobe reagiert, wird dabei bei 1+9-verdünntem Serum ein Signal oberhalb der Kamerasättigung von 65.535 a.u. erreicht. Auch die Spot-Signale der Antigene steigen mit beiden Verdünnungsstufen des Serums bei der höheren Assay-Temperatur deutlich an. Dies bestätigt den positiven Effekt der Temperaturerhöhung auf die Signalerzeugung.

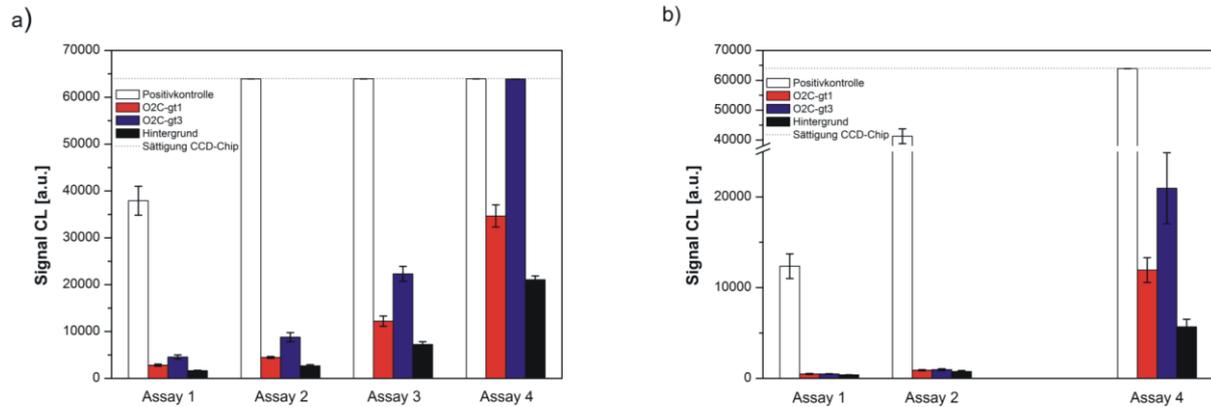


Abbildung 3.3: Einfluss der Inkubationsbedingungen für Probe und Detektionsantikörper auf das CL-Signal. Messungen mit Serum H 2 in a) 1+9-Verdünnung bzw. b) 1+100-Verdünnung auf Basis der HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 nach Dialyse in SDS-freien Spottingpuffer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$), die gestrichelte Linie stellt das der Kamerasättigung entsprechende CL-Signal dar.

Für die Sensitivität des Assays ist jedoch nicht nur das spezifische Signal der Antigene ausschlaggebend, genauso wichtig ist das unspezifische Signalverhalten. Hier wirkt sich die Temperaturerhöhung in einer Erhöhung des Hintergrundsignals aus, so dass sich bei Berechnung des sich ergebenden Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses keine wesentliche Verbesserung der Assay-Sensitivität ergibt. Die mit den jeweiligen Assay-Varianten erzielten SNR-Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Resultierende SNR-Werte bei Variation der Assay-Bedingungen für den Nachweis von anti-HEV IgG. Die Messungen wurden mit Serum H 2 am Messgerät des PATH₂OGENSCAN-Projektes durchgeführt.

| | | Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | Assay 4 |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Verdünnung | Antigen | SNR | SNR | SNR | SNR |
| 1+9 | O2C-gt1 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,6 |
| | O2C-gt3 | 2,8 | 3,3 | 3,1 | n. b. |
| 1+100 | O2C-gt1 | 1,3 | 1,2 | | 2,1 |
| | O2C-gt3 | 1,3 | 1,3 | | 3,7 |

Wird bei 40 °C der Assay so modifiziert, dass der Detektionsantikörper in Intervallen und damit mit einer deutlich höheren Interaktionszeit zugegeben wird (Assay 3), so ist keine Verbesserung des SNR feststellbar, da sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Signale ansteigen. Wird zusätzlich die Flussrate der Serumzugabe von 10 µL/s um den Faktor 20 auf die minimale Geschwindigkeit von 0,5 µL/s abgesenkt und damit die Interaktionszeit der Probe mit den Rezeptoren von 100 s auf 2000 s erhöht, so wird bei der 1+9-Verdünnung für O2C-gt3 ein Signal im Bereich der Kamerasättigung gemessen. Diese Variation des Assays beeinflusst also am stärksten die Signale, allerdings steigt wie zu erwarten auch bei diesen Bedingungen das Hintergrundrauschen. Während dies bei der höheren Serumkonzentration zu einem unveränderten SNR-Wert führt, lässt sich mit der 1+100-Verdünnung eine leichte Verbesserung des SNR mit Assay 4 verglichen zu Assay 2 messen, was darauf hindeutet, dass die Kinetik der spezifischen Bindung bei längeren Inkubationszeiten leicht begünstigt wird. Der Nachteil bei der Reduktion der Flussraten liegt allerdings in der deutlichen Verlängerung der Assaydauer, die durch die Änderung statt ca. sechs Minuten für Assay 1 deutlich mehr als 30 Minuten für Assay 4 beträgt. Der Effekt auf das erreichbare SNR ist daher nicht deutlich genug, um den Assay auf Kosten der Probenmessdauer abzuändern, da die Attraktivität der Mikroarray-Methode auf ihrem Zeitvorteil gegenüber stationären Immunoassays beruht. Mit der 1+9-Verdünnung wurden etwas bessere Ergebnisse erzielt, doch die Verwendung dieser Konzentration war alleine aufgrund des damit verbundenen hohen Probenverbrauchs nicht erstrebenswert und hätte die Vergleichbarkeit des CL-MIA-Assays mit den stationären Konkurrenzmethoden erschwert. Daher wurden bei der Assay-Abarbeitung die Seren weiterhin 1+100 verdünnt und die Serumprobe mit einem kontinuierlichen Fluss von 10 µL/s über den Chip geleitet.

Fazit

Mit Hilfe der Voruntersuchungen konnte ein Protokoll zur Durchführung eines CL-MIAs am MCR 3 zum Nachweis von Serumantikörpern innerhalb von weniger als neun Minuten entwickelt werden.

Insgesamt zeigen die Experimente, dass Serum eine sehr komplexe Matrix darstellt, die sehr viele ungerichtete Bindungen an der Chipoberfläche erzeugt. Um höhere Signale bzw. höhere SNR-Werte zu generieren, wurde daher das Hauptaugenmerk auf die Modifizierung der Oberflächenbehandlung gelegt, die im Idealfall das spezifische Signal erhöhen und die Chipoberfläche besser gegen unspezifische Anlagerungen schützen soll (siehe Kapitel 3.2).

3.1.2 Experimentelle Untersuchung der HEV-Antigen-Aktivitäten unter verschiedenen Pufferbedingungen

Aufgrund der Notwendigkeit einer Erhöhung der spezifischen Signale wurden auch die Pufferbedingungen während des Immobilisierungsvorganges der Antigene untersucht. Hier bestand die Herausforderung darin, die Aktivität bzw. Reaktivität der rekombinanten Antigene zu gewährleisten. Bei der Herstellung rekombinant exprimierter Antigene durch die Fa. Mikrogen werden die Proteine während und nach der Aufreinigung in denaturierende Bedingungen überführt, um die Aggregation bzw. Präzipitation der Proteine zu verhindern und die Lagerstabilität der Antigene zu garantieren. Die für den HEV-Assay verwendeten Antigene der ORF3- bzw. ORF2-Region lagen daher entweder in einem MOPS-Puffersystem vor, das mit 10 mM DTE und 0,05 % SDS versetzt worden war, oder in einem Tris-Puffer, der einen Harnstoffgehalt von 8 M und einen DTE-Gehalt von 2 mM aufwies. Bei beiden Puffersystemen sollte durch diese Zusätze sowohl die Disulfid-Aggregation als auch die hydrophobe Aggregation unterbunden werden und die Lösungen bei Lagerung bei -80 °C über einen längeren Zeitraum stabil sein. Die Stabilität von Proteinen, insbesondere von nicht nativen Proteinen, wird von zahlreichen Faktoren der Umgebungsbedingungen beeinflusst (Chi, 2003). Die wichtigsten Einflussfaktoren sind dabei im Bereich des Lösungsmittels der pH-Wert sowie die Ionenstärke und Chaotropie der vorliegenden Puffersalze. Über den Zusatz von Detergenzien und stabilisierenden Reagenzien kann die Stabilität der Proteine in Lösung positiv beeinflusst werden. Nicht nur die Umgebungsbedingungen bestimmen die Stabilität der Proteine, sondern die mit der Proteinstruktur verbundenen Möglichkeiten der inter- und intramolekularen Interaktionen, die über elektrostatische oder van-der-Waals-Wechselwirkungen zustande kommen. Auch Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbindungen können die Struktur eines einzelnen Moleküls verändern oder sich in Form von Aggregatbildung auf die Löslichkeit aller Moleküle auswirken. Sind schon bei nativen Proteinen mit Blick auf die thermodynamischen Parameter die für ihre Aufgaben im Stoffwechsel aktiven und damit „richtigen“ Konformationen oft nur durch kleine Energieunterschiede von anderen Konformationen abgegrenzt, so ist für rekombinante Antigene, die im Wesentlichen nur die entscheidende Bindungsregion enthalten, die stabilisierende Gesamtstruktur des kompletten Proteins nicht gewährleistet. Damit muss nicht unbedingt eine irreversible Aggregation und Präzipitation einhergehen, es kann aber anstelle der richtigen Faltung in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen eine Fehl- oder

Teilfaltung auftreten, welche die Zugänglichkeit des Epitops einschränkt oder seine Formation verhindert. Eine solche Konformation erlaubt dann keine effektive Bindung des Zielanalyten mehr und erhöht die Wahrscheinlichkeit unerwünschter intramolekularer Wechselwirkungen.

Die Zugabe von SDS oder Harnstoff und zusätzlich DTE ist eine effektive Methode, um Proteine im denaturierten Zustand zu halten und somit unerwünschte inter- und intramolekulare Bindungen zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen ist aber eine verminderte Seroreaktivität der Antigene zu erwarten. Daraus ergibt sich die Fragestellung, inwieweit die Pufferbedingungen während der Immobilisierung auf dem Chip die spätere Reaktivität der Antigene mit den Antikörpern beeinflusst und ob eine Rückfaltung hierfür notwendig bzw. möglich ist.

Bei CL-MIA-Messungen mit einem Serum, das als eines von wenigen Schweineseren im LIA sowohl mit ORF3- als auch mit ORF2-basierten Antigenen hohe Reaktivität zeigte, konnte festgestellt werden, dass die Spots des Antigens O3-gt3 (gelöst im MOPS-SDS-Puffersystem) hohe Signale zeigten, während für die Spots des Antigens O2C-gt3 unter diesen Bedingungen nur sehr geringe Signale resultierten. Als Erklärung kommt für dieses Verhalten entweder eine geringe Immobilisierungseffizienz oder aber eine geringe Aktivität von O2C-gt3 in Frage. Um mehr Informationen in diesem Bereich zu erhalten, wurde auf das klassische Mikrotiterplattenformat gewechselt, mit welchem das Verhalten der Antigene unter verschiedenen Pufferbedingungen einfacher und parallel getestet werden kann. Dabei wurden sowohl die Harnstoff- als auch die SDS-haltigen Stammlösungen von O3-gt3 und O2C-gt3 für die Immobilisierung getestet. Für diese ELISA-Messungen wurden die Kontrollseren des kommerziellen ELISA-Kits PrioCheck® HEV porcine (Prionics) verwendet und das Signal klassisch über eine Farbreaktion mit TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) erzeugt. Anhand der Absorption der Kontrollseren (Positiv-, *Cut-Off*-, Negativkontrolle) konnte überprüft werden, ob die Ergebnisse der einzelnen ELISAs unter den jeweiligen Bedingungen den für den kommerziellen Test geforderten Kriterien entsprachen. Zusätzlich wurde das hochpositive Serum, welches zur Einstellung der Positivkontrolle verwendet worden war, mitgetestet. Bei Analyse der insgesamt vier Kontrollseren konnten damit bei Dreifachbestimmung auf einer 96-well-Platte bis zu acht verschiedene Beschichtungsbedingungen parallel ausgetestet und die Assay-Signale auch absolut miteinander verglichen werden.

Der große Unterschied bei der Immobilisierung besteht zwischen Mikrotiterplatten- und Mikroarray-Format neben der unterschiedlichen Bindungsstrategie (adsorptiv vs. kovalent) in

den benötigten Proteinmengen. Für die Mikroarray-Assays am IWC haben sich Rezeptorkonzentrationen zwischen 0,1 mg/mL und 1 mg/mL als ideale Konzentrationen für eine ausreichend hohe Belegungsdichte auf dem Spot erwiesen. Für klassische ELISA-Beschichtungen werden dagegen üblicherweise wesentlich niedrigere Konzentrationen im ng/mL-Bereich benötigt. Nach Optimierung der Konzentrationen für Beschichtung (*coating*) und Detektionsantikörper mittels *checkerboard titration* wurden die HEV-Antigen-Stammlösungen in einer Konzentration von 125 ng/mL für die Beschichtung hochbindender PS-Titerplatten eingesetzt. Je nach Ausgangskonzentration entsprach dies einer Verdünnung der Stammlösungen von mehr als Faktor 1.000, da die Stammkonzentrationen der verschiedenen Antigene nach Angaben von Mikrogen zwischen 0,20 mg/mL und 1,48 mg/mL variierten. Bei der Herstellung von rAg-Mikroarrays ist dagegen kaum Spielraum für eine Verdünnung der Antigene, ohne die Immobilisierungsausbeute negativ zu beeinflussen. Eine hohe lokale Proteinkonzentration begünstigt jedoch Fehlfaltungen und beschleunigt die Proteinaggregation (Stefani, 2008).

Um den Einfluss der Pufferbedingungen auf die Antigene zu testen, bot sich für den ELISA die einfache Möglichkeit, die in der Stammlösung vorherrschenden Bedingungen durch Verdünnung mit Coatingpuffer deutlich zu verändern. Wird ein Beschichtungspuffer verwendet, der keine denaturierenden Reagenzien enthält, so wird z.B. für das Antigen O2C-gt3 im MOPS-Puffersystem ($c = 0,64 \text{ mg/mL}$) durch die Verdünnung um mehr als Faktor 5.000 die Konzentration an DTE und SDS in den nM-Bereich verschoben, so dass kaum mehr denaturierende Bedingungen vorliegen. Gleichzeitig können bei Zusatz dieser denaturierenden Reagenzien in den Konzentrationen der Ausgangspuffer zum Coatingpuffer die Bedingungen, die bei der Immobilisierung der Antigene auf dem Chip vorherrschen, simuliert werden.

Für die ersten Untersuchungen wurden daher Mikrotiterplatten mit Antigenen, welche in Carbonatpuffer (pH 9,6) mit und ohne Zusatz von DTE und SDS gelöst worden waren, beschichtet. Das Beschichtungs- und Abarbeitungsprotokoll für den stationären Assay ist in Kapitel 6.4 detailliert beschrieben. Bei den Assay-Schritten wurde sich an den Inkubationsbedingungen für das kommerzielle ELISA-Kit orientiert.

Die beschichteten Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend in 1 %-Casein-haltigem PBS-Puffer geblockt. Anschließend wurden die 1+100 in PBS verdünnten Seren in die Kavitäten eingefüllt und die Platten bei 37 °C für eine Stunde in einen Schüttelinkubator gestellt. Nach der Probeninkubation und einem Waschschrift wurde der

HRP-markierte Detektionsantikörper Ziege anti-Schwein IgG in einer Verdünnung von 1:25.000 (20 ng/mL) zugegeben und die Platten für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend an einen weiteren Waschschrift erfolgte die Farbreaktion. Hierfür wurde ein Gemisch des Farbstoffes TMB mit Wasserstoffperoxid zugegeben und die Reaktion bis zur Einstellung einer deutlichen Blaufärbung der Positivkontrolle entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die Platten bei 450 nm ausgelesen. In Abbildung 3.4 ist exemplarisch eine Titerplatte gezeigt, auf welcher die Antigene O3-gt3 bzw. O2C-gt3 nach Beschichtung mit und ohne denaturierende Zusätze im Coatingpuffer beprobt wurden.



Abbildung 3.4: Farbreaktion der Assays bei Beschichtung der Antigene O2C-gt3 und O3-gt3 mit bzw. ohne denaturierende Zusätze.

Bereits optisch lassen sich die unterschiedlichen Auswirkungen des Zusatzes von SDS und DTE/DTT zum Beschichtungspuffer auf die jeweiligen Reaktivitäten gut erkennen.

Werden beide Antigene ohne denaturierende Reagenzien immobilisiert, so zeigen in beiden Fällen sowohl Positivserum als auch Positivkontrolle eine starke Farbreaktion, während die Negativkontrolle kaum Reaktivität zeigt. Die Assays entsprechen damit den Kriterien für einen aussagekräftigen Nachweis von anti-HEV IgG. Werden dagegen die Reaktivitäten betrachtet, die sich bei Verwendung eines Beschichtungspuffers, der 0,05 % SDS und 10 mM DTT (wirkungsgleiches Diastereomer von DTE) enthält, so zeigt sich ein gegensätzliches Verhalten. Während für O3-gt3 keine Auswirkung auf das Bindungsverhalten zu beobachten ist, liefert O2C-gt3 für die positiven Seren nur noch ein sehr geringes Signal (optische Dichte, OD), welches kaum die Farbreaktion der *Cut-Off*-Kontrolle übertrifft. Dieser Assay erfüllt das

Kriterium des kommerziellen Assays, der einen Unterschied der OD-Werte von Positiv- und Cut-Off-Kontrolle von mindestens 0,3 vorsieht, bei Weitem nicht. Für die Aktivität des Antigen O2C-gt3 sind also die Bedingungen während der Immobilisierung von großer Bedeutung. Dieser Befund erklärt somit die Ergebnisse des CL-MIAs, die eine niedrige Reaktivität des Antigen O2C-gt3 bei Verwendung der SDS-haltigen Stammlösung als Spottinglösung ergeben hatte, während mit O3-gt3 hohe Signale gemessen werden konnten.

Der negative Einfluss auf die Aktivität konnte im weiteren Verlauf ebenso in ELISA-Experimenten basierend auf O2C-gt1 und für Antigene, die im Tris-Harnstoff-Puffersystem vorlagen, ermittelt werden. Eine mögliche Begründung für diese Resultate könnte in der Struktur der Epitope liegen. Während das Bindungsepitop des ORF2-Motivs vermutlich eine 3D-Struktur und damit eine richtige Faltung des rekombinanten Antigen erfordert, liegt bei ORF3, welches insgesamt nur 123 Aminosäuren umfasst, möglicherweise ein lineares Epitop vor, das eine Bindung der Antikörper auch unter denaturierenden Bedingungen erlaubt.

Da im Serenscreening mittels LIA-Test festgestellt werden konnte, dass keines der verfügbaren Seren ausschließlich mit Antigenen der ORF3-Region reaktiv war und somit die ORF2-basierten Antigene für einen seropositiven Befund ausschlaggebend sind, mussten also Lösungen gefunden werden, welche das Problem der niedrigen Antigen-Reaktivitäten für die ORF2-Antigene im Mikroarray lösen.

Zunächst wurde mittels ELISA-Test untersucht, ob eine moderate Verdünnung der Stammlösungen eine Option bieten könnte, die Aktivität der ORF2-Antigene wiederherzustellen und dennoch eine ausreichend hohe Antigen-Konzentration für die Mikroarray-Beschichtung zu gewährleisten. Hierfür wurde der Carbonatpuffer mit verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff, SDS und DTT versetzt und die Farbreaktionen unter diesen Bedingungen mit denen bei Verwendung des reinen Carbonatpuffers verglichen. Exemplarisch sind in Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 die Ergebnisse der durchgeführten Puffertests wiedergegeben. Zur besseren Darstellung wurde der SDS-Gehalt nicht in Massenprozent, sondern in Molaritäten angegeben, wobei die SDS-Konzentration der Stammlösung von 0,05 % (w/v) 1,73 mM entspricht.

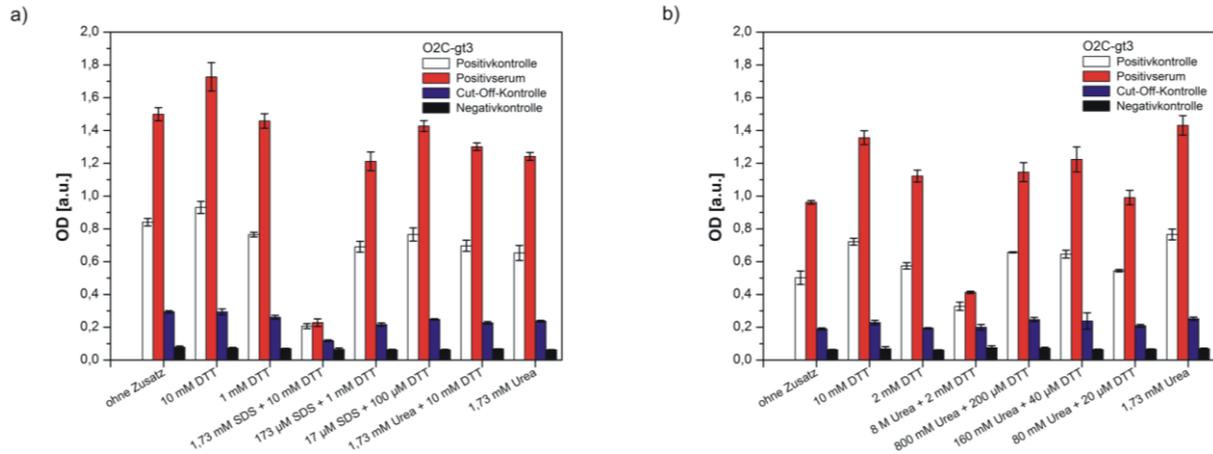


Abbildung 3.5: Vergleich der Absorptionen von ELISA-Messungen auf Basis von O2C-gt3 aus a) SDS-haltiger Stammlösung bzw. b) Harnstoff (Urea)-haltiger Stammlösung und Verwendung verschiedener Zusätze im Beschichtungspuffer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Inter-Assay-Abweichungen ($m = 3$).

Grundsätzlich konnte für beide Antigene festgestellt werden, dass bei Verwendung des SDS-haltigen Puffersystems höhere Signale erreicht werden können als mit dem Harnstoff-Puffer. Dies zeigte sich bei Vergleich der Verdünnung der Stammlösungen mit reinem Coatingpuffer, wobei der Effekt für O2C-gt1 größer ist als bei O2C-gt3. Der Grund hierfür liegt in der sehr hohen Ursprungskonzentration des Harnstoffs in der Stammlösung (8 M), die auch nach der Verdünnung immer noch hoch genug ist, um die Aktivität der Antigene einzuschränken.

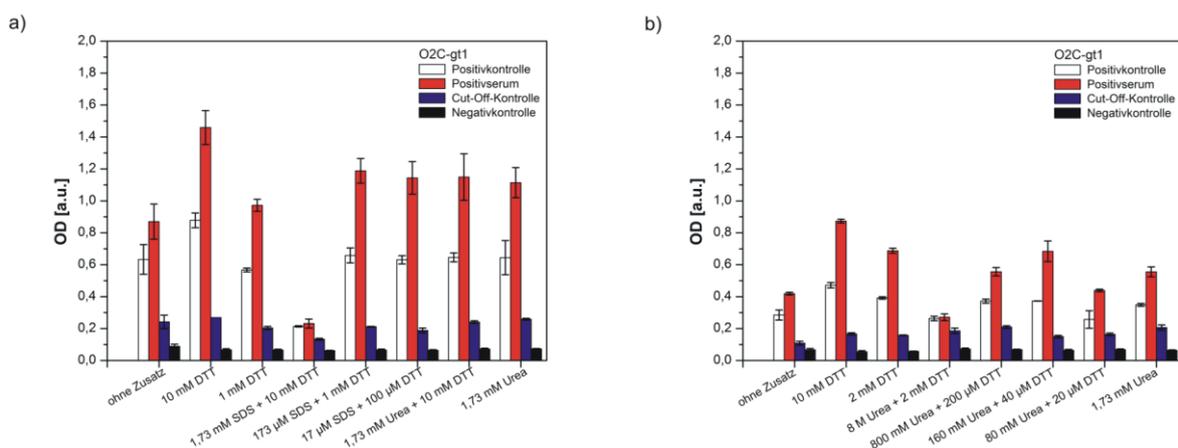


Abbildung 3.6: Vergleich der Absorptionen von ELISA-Messungen auf Basis von O2C-gt1 aus a) SDS-haltiger Stammlösung bzw. b) Harnstoff (Urea)-haltiger Stammlösung und Verwendung verschiedener Zusätze im Beschichtungspuffer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Inter-Assay-Abweichungen ($m = 3$).

Die jeweils niedrigsten Signale wurden wie erwartet unter denjenigen Beschichtungsbedingungen erhalten, welche den denaturierenden Konditionen der jeweiligen Stammlösung entsprechen.

Ein Unterschied ergibt sich für die beiden Puffersysteme bei Durchführung einer Verdünnungsreihe für die denaturierenden Zusätze. Werden die Puffersysteme unter Beibehaltung der relativen Konzentrationsunterschiede für SDS und DTT bzw. Harnstoff und DTT eingestellt, so ergibt sich für das SDS-System ein gleichmäßiger Trend zu höheren Signalen mit zunehmender Verdünnung, während für das Harnstoff-System gewisse Schwankungen messbar sind. Dies zeigt, dass auch die Verhältnisse der Reagenzien untereinander einen Einfluss auf die resultierende Aktivität der Antigene besitzen.

Generell konnte als Fazit dieser Puffertests experimentell festgestellt werden, dass mindestens eine 1:10-Verdünnung der Stammlösungen notwendig erscheint, um die Aktivität der Antigene im ELISA wiederherzustellen. Eine solch hohe Verdünnung der Antigene würde jedoch im Mikroarray zu einer sehr niedrigen Kopplungsausbeute und damit folglich zu sehr niedrigen CL-Signalen führen (vergleiche Abbildung 3.18). Daher schied die Verdünnung der Stammlösungen als einfach zu realisierende Option für eine Erhöhung der Signale im CL-MIA aus.

Eine zweite Möglichkeit, die Pufferbedingungen zu variieren, stellt der Pufferaustausch dar. Damit können die denaturierenden Pufferzusätze entfernt werden, ohne die Konzentration des Antigens in Lösung zu verringern. Nachdem in den Puffertests im ELISA gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von DTT im Beschichtungspuffer zu höheren Signalen führt als der reine Beschichtungspuffer (siehe Abbildung 3.5 und 3.6), wurde ein Puffer, der 10 mM DTT enthält, als Matrix eines Spottingpuffers getestet. Die positive Wirkung des DTT-Zusatzes ergibt sich vermutlich aus der Verhinderung intermolekularer Disulfidbrücken, was eine Agglomeration der Antigene in ihrer bei Abwesenheit von SDS aktiven Raumstruktur unterbindet.

Es wurden verschiedene Puffersysteme als mögliche Spottingpuffer untersucht. Neben dem MOPS-Puffersystem der Antigen-Stammlösungen wurden auch PBS-Puffer und Carbonat-Puffer als Spottingpuffer getestet. Mit diesen Puffern konnten an einzelnen Messtagen CL-Signale für O2C-gt1 und O2C-gt3 gemessen werden, die im direkten Vergleich mit den Signalen der mit den Stammlösungen gespotteten Antigene deutlich höhere Intensitäten aufwiesen. Allerdings wurde bei Vergleich der Ergebnisse verschiedener Messtage eine sehr

geringe Reproduzierbarkeit der Signale festgestellt. Zum Teil ist dies in der praktischen Umsetzung des Pufferaustausches begründet. Dieser wurde in den ersten Versuchen mittels Dialyseschläuchen durchgeführt. Aufgrund der kleinen Volumina der Antigen-Aliquote, die zur Verfügung standen, war insbesondere die Rückgewinnung von 35 - 50 μL Antigenlösung nicht reproduzierbar. Auch die getesteten Dialyseeinheiten waren für solch geringe Volumina nicht geeignet und führten aufgrund des Eindringens von Pufferlösung durch die Membran zu einer unerwünschten Verdünnung der Antigene. Daher wurde in weiteren Versuchen auf Ultrazentrifugationseinheiten zurückgegriffen. Diese werden üblicherweise zur Aufkonzentrierung von Proteinen in Lösung eingesetzt, indem mittels Zentrifugation ein Großteil des Lösungsmittels entfernt wird. Dieser Vorgang kann auch dazu genutzt werden, die Zusammensetzung des Puffers zu verändern, indem der Rückstand nach Zentrifugation in der gewünschten Puffermatrix aufgenommen wird. Bei Wiederholung dieser Vorgehensweise kann der Austausch der Pufferumgebung zu fast 100 % erfolgen. Der Nachteil dieser Methode liegt im Verlust von Proteinen bei jedem Zentrifugationsschritt durch deren Adsorption an der Filtermembran und den Wänden. Darüber hinaus ist trotz der Wahl einer geeigneten Porengröße (*molecular weight cut-off*, MWCO) der Membran mit Verlusten zu rechnen. Der Hersteller der verwendeten Amicon-Filtereinheiten geht zwar von einer Wiedergewinnungsrate eines Proteins mit dreifacher Größe des Membran-Cut-Offs von mindestens 90 % aus, bei wiederholter Zentrifugation stellt dies jedoch einen deutlichen Verlust an Antigen dar. Gleichzeitig ist die Gefahr von Aggregationen bei der Zentrifugation höher als bei der Dialyse, da hier der Wechsel der Umgebungsbedingungen sehr viel schneller erfolgt und sich gleichzeitig die lokale Proteinkonzentration schnell erhöht. Gerade die Änderung der pH-Bedingungen, wie sie zum Beispiel vom MOPS-Puffer (pH 7,2) hin zum Carbonat-Puffer (pH 9,6) auftritt, kann bei schneller Überschreitung des naiven pI-Wertes von 7,6 (O2C-gt1) bzw. 7,9 (O2C-gt3) eine Aggregation bzw. Präzipitation der rekombinanten Proteine auslösen. Für das Umpuffern der Stammlösungen stellt dies aufgrund der hohen Antigen-Konzentration ein wesentlich höheres Risiko als bei der Verdünnung der Stammlösung bei der Beschichtung der ELISA-Platten dar, da hier für die Antigene durch den hohen Verdünnungsfaktor eine deutlich geringere Interaktionswahrscheinlichkeit auftritt. Bei den Filtrationstests wurde 50- μL -Aliquote der Stammlösungen mit 450 μL des Spottingpuffers verdünnt und in 500 μL -Amicon-Filtereinheiten (MWCO 10 kDa) für 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Rückstand wurde mittels Überkopfzentrifugation für zwei Minuten bei 1.000 rpm wiedergewonnen. Das Volumen des Rückstands variierte

zwischen 20 und 25 μL , d.h. neben der Reduzierung des SDS-Gehaltes um den Faktor zehn wurde gleichzeitig die Antigen-Konzentration erhöht.

Das Auftreten von Aggregationseffekten liefert neben der technischen Handhabung die zweite Begründung für die mangelnde Reproduzierbarkeit der CL-MIA-Messungen mit Antigenen in SDS-freier Umgebung. Auch das Herstellungsprotokoll der Mikroarray-Chips, bei denen die Antigen-Spots während bzw. nach dem Spotting-Vorgang eintrocknen, könnte negative Konsequenzen auf die Aktivität der Antigene haben.

Um die Schwierigkeiten des Puffertauschs zu umgehen, wurden von Mikrogen für Antigenlösungen von O2C-gt3 mit höheren Proteinkonzentrationen (2,06 mg/mL statt 0,62 mg/mL) und auch geringerem SDS-Gehalt (0,02 %) bereitgestellt. Die erreichten Signalintensitäten lagen jedoch lediglich im Bereich der Signale, welche unter den ursprünglichen Pufferbedingungen resultierten. Hier zeigte sich, dass eine höhere Spottingkonzentration keine Verbesserung mit sich brachte, da die Spotoberfläche vermutlich bereits bei geringerer Konzentration mit Antigenen gesättigt ist, so dass alleine der Anteil richtig gefalteter und damit reaktiver Antigene für das spätere Signal des CL-MIAs ausschlaggebend ist. Trotz der mangelnden Reproduzierbarkeit wurde daher das Antigen O2C-gt3 in den weiteren Untersuchungen stets vor dem Spotting in SDS-freiem Medium zentrifugiert und der Rückstand direkt für den Spottingvorgang eingesetzt. Aus Gründen der Beibehaltung des pH-Wertes und der gleichen Chaotropie der Stammlösung wurde hierfür ein MOPS-Puffer mit 10 mM DTT und zur Stabilisierung 0,01 % Tween-20 verwendet (Spottingpuffer IV).

Fazit

Die Untersuchung der Antigen-Aktivitäten zeigte, dass für die ORF2-basierten Antigene die bei der Immobilisierung gewählten Pufferbedingungen den entscheidenden Einflussfaktor auf die gemessenen Signale darstellen. Unter denaturierenden Bedingungen war eine stark reduzierte Aktivität dieser Antigene feststellbar, so dass ein Tausch der Pufferbedingungen angestrebt wurde. Mit den vorhandenen Möglichkeiten konnte allerdings keine Methode etabliert werden, die ein reproduzierbares Umpuffern kleiner Volumina erlaubt hätte. Nach Optimierung der Oberflächenchemie (siehe Kapitel 3.2) resultierte jedoch für das Antigen O2C-gt1 ein Messsignal bei Verwendung der SDS-haltigen Stammlösung (Spottingpuffer II), welches für einen sensitiven Nachweis von anti-HEV IgG ausreichte. Für O2C-gt3 war dagegen eine Überführung in einen SDS-freien MOPS-Puffer vor dem Spotting erforderlich.

3.1.3 Test auf Regenerierbarkeit von HEV rAg-Mikroarrays

3.1.3.1 Voraussetzungen für einen regenerierbaren Durchfluss-Mikroarray-Chip

Der Vorteil der kovalenten Bindungsstrategie für Mikroarray-Chips im Unterschied zur adsorptiven Bindung bei Mikrotiterplatten-Assays ist zumindest in der Theorie die Möglichkeit, die Chips wiederverwenden zu können, indem nach der Assay-Durchführung die Analyten von ihrem immobilisierten Rezeptor abgelöst werden, während der Rezeptor-Ligand auf der Oberfläche verbleibt. Diese Definition ist sehr wichtig, da im Bereich der Biosensoren zum Teil die Wiederverwendbarkeit von Sensoroberflächen darauf bezogen wird, dass die Oberfläche mehreren Messungen standhält, der Rezeptor aber vor jedem Assay wieder neu aufgetragen wird.

Einer regenerierbare Assay-Methode soll jedoch gerade den Vorteil mit sich bringen, die Rezeptoren einmalig auf der Oberfläche zu immobilisieren und durch Zugabe eines Regenerationspuffers lediglich den Antigen-Antikörper-Komplex aufzulösen, so dass der Rezeptor in der nächsten Messung in unveränderter Form wieder zur Verfügung steht. Dies ist dann mit einer deutlichen Kostenreduktion für die nötigen Reagenzien für die Oberflächenchemie und für die Herstellung des Rezeptors verbunden.

In der Praxis stellt die Wahl geeigneter Regenerationsbedingungen allerdings eine große Herausforderung dar. Es müssen dabei verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die eine Entfernung des gebundenen Analyten von der Oberfläche erlauben, ohne die Reaktivität des Rezeptors für die weiteren Bindungsreaktionen einzuschränken.

Die Stabilität des Antigen-Antikörper-Komplexes hängt maßgeblich von Assoziation bzw. Dissoziation der freien Komponente ab, d.h. im Fall des verwendeten Assays von der Anbindung der Zoonose-Antikörper an das Epitop des immobilisierten rekombinanten Antigens. Je höher dabei die Affinität und die Avidität der IgG-Antikörper ist, desto mehr verschiebt sich die Reaktion auf die Seite der Assoziation, da die Antikörper stärker binden. Die Lösung des Komplexes wird dadurch erschwert. Daher muss experimentell bestimmt werden, unter welchen Bedingungen die Dissoziation verstärkt werden kann. Bei der Wahl der Methode zur Auflösung des Komplexes bei der Mikroarray-Methode ist auch die Struktur und die Stabilität des Rezeptors ein wichtiges Kriterium. Für die verwendeten Antigene wurde in Kapitel 3.1.1 bereits darauf eingegangen, wie leicht Proteine ihre Reaktivität verlieren, wenn sie ungeeigneten Bedingungen ausgesetzt werden. Eine Denaturierung der Antigene würde zu einer Veränderung des Bindungsepitops und damit zu einem Verlust der

Bindungseigenschaften führen. Während also denaturierende Effekte für die Lösung des Antikörpers vom Antigen ausgenutzt werden können, kann sich die Wirkung negativ auf die Struktur und damit die Reaktivität der Antigene auswirken.

Eine weitere Voraussetzung für einen wiederverwendbaren Chip betrifft neben der effektiven Entfernung der Antikörper die Oberfläche. Diese muss vor einer kontinuierlichen Anlagerung von Matrixbestandteilen (*Biofouling*), die zu einer Erhöhung des unspezifischen Hintergrundsignals führen würde, geschützt werden. Die Ablagerung von Matrixkomponenten auch auf den Spotflächen kann zusätzlich die Zugänglichkeit der Fängermoleküle erschweren.

Bei den Assays am MCR 3 stellt das Durchfluss-Prinzip eine weitere Problematik dar. Die wirkenden Scherkräfte können eine Ablösung von Rezeptoren bewirken, welche sich in einem kontinuierlichen Signalabbau im Verlauf mehrerer Messzyklen zeigen können.

Die einfachste Methode, den Antigen-Antikörper-Komplex zu lösen, besteht in einer deutlichen Veränderung des pH-Wertes. Ausgehend von einem physiologischen neutralen pH-Wert des Laufmittels kann durch die Zugabe eines sauren oder basischen Puffers, häufig in Kombination mit SDS, die Raumstruktur des Paratops verändert bzw. der Antikörper denaturiert werden. Auch die Änderung der Ionenstärke durch Verwendung von Kaliumthiocyanat, Magnesiumchlorid oder Guanidinium-Hydrochlorid kann den Komplex auflösen, genauso wie die Zugabe von organischen polaren Lösungsmitteln wie DMSO oder Methanol eine Dissoziation des Komplexes bewirken kann. Eine detaillierte Übersicht verschiedener Puffersysteme zur Regeneration eines Antikörper-beschichteten Immunosensor-Chips wird von Kandimalla *et al.* gegeben (Kandimalla, 2004). Hauptsächlich sind regenerierbare Sensoroberflächen für die SPR-Analytik etabliert, wobei hier je nach Analyt und Ligand verschiedenste Puffer verwendet werden (Olaru, 2013). In der Regel wird bei dieser Methode das Regenerationsprofil anhand der Basislinie ausgewertet, d.h. es wird beurteilt, ob nach Zugabe des Regenerationspuffers wieder ein Null-Signal erreicht wird. Dies ist für diese Methodik, die auf der Messung einer Schichtdickenänderung durch spezifische Anlagerung beruht, das wesentliche Kriterium für eine Mehrfachverwendung einer Chipoberfläche. Für Mikroarray-Assays, die aus der Höhe eines Signals mindestens eine semiquantitative Aussage über die Analyt-Konzentration treffen sollen, ist es jedoch sinnvoller, neben der Überprüfung der Entfernung der Analyt-Moleküle die Signale des nachfolgenden Assays auszuwerten und sich somit auf das erreichbare Maximalsignal über

mehrere Messzyklen hinweg zu beziehen. In einzelnen Studien wurden auch klassische Immunoassays mit Enzym-Markierung beschrieben, bei denen ein Fängerantikörper über mehrere Messzyklen hinweg stabil an der Oberfläche gebunden bleibt und nur geringe Signalverluste festgestellt werden konnten (Wijesuriya, 1994; Yang, 2010). Hier wurde das Puffersystem HCl-Glycin in einem Bereich von pH 2 eingesetzt.

Mit diesem Puffersystem und Zusatz von 0,1 % SDS konnten am IWC bereits regenerierbare kompetitive Assays mit immobilisierten kleinen Molekülen (*small analyte immunoassays*) für den Nachweis von Antibiotika in Milch und Honig bzw. von Mykotoxinen in Getreideextrakten etabliert werden (Kloth, 2009 b; Oswald, 2013; Wutz, 2011). Bei diesen Assays sind die verwendeten Liganden Derivate der Antibiotika bzw. der Mykotoxine, die keiner Denaturierungsgefahr unterliegen. Allerdings ist in Abhängigkeit von der Struktur dieser organischen Moleküle mit molaren Massen von maximal 1.000 g/mol nicht auszuschließen, dass auch hier in stark saurem Milieu Reaktionen wie Ringöffnungen oder Isomerisierungen ablaufen können, die einen Verlust der Bindungsfähigkeit mit sich bringen.

3.1.3.2 Experimente zur Regenerierbarkeit von HEV rAg-Mikroarrays

Ziel der Experimente zur Regenerierbarkeit war es, für die beiden rekombinanten HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 zu testen, ob ohne größeren Optimierungsaufwand eine Mehrfachverwendung der Mikroarray-Chips möglich ist und damit ein regenerierbarer Assay für den Nachweis von anti-HEV IgG verwendet werden kann.

Für die Versuche wurde das HCl-Glycin-Puffersystem (10 mM Glycin, 100 mM NaCl, HCl) gewählt. Die Zugabe des Regenerationspuffers am MCR 3 erfolgte in den gleichen Mengen und Flussraten wie sie im Assay-Ablauf für den Antibiotika-Nachweis etabliert worden war. Dazu wurden nach den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Assay-Schritten und Spülschritten die Zugabe des Regenerationspuffers angeschlossen. Dabei wurden 4 mL des Puffers in Pumpe P4 aufgezogen und davon 3 mL mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{L/s}$, die verbleibenden 1.000 μL mit einer geringeren Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ über den Chip geleitet. Zum Schluss wurde die Flusszelle mit 2 mL Laufpuffer gespült.

Zunächst wurde ein Puffer mit pH 3,0 auf seine Wirkung getestet. Dazu wurde nach der Zugabe des Regenerationspuffers wieder Detektionsantikörper und CL-Substrate zugegeben und ein Bild aufgenommen. Bei Entfernung aller HEV-Antikörper sollte keine Markierung möglich und somit auch keine Spots sichtbar sein. Wie in Abbildung 3.7 a zu erkennen,

zeigen die Spots zum Teil einen *Donut*-Effekt, es ist bei diesem pH-Wert jedoch noch ein deutliches Signal messbar (ca. 30 % des ursprünglichen Signals), d.h. die Antikörper sind zum Teil noch am Antigen gebunden. Daraufhin wurde der pH auf einen Wert von 2,0 gesenkt und zudem ein Zusatz von 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Unter diesen Bedingungen konnten keine Spots mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7 b), was eine Grundvoraussetzung für einen regenerierbaren Chip darstellt.

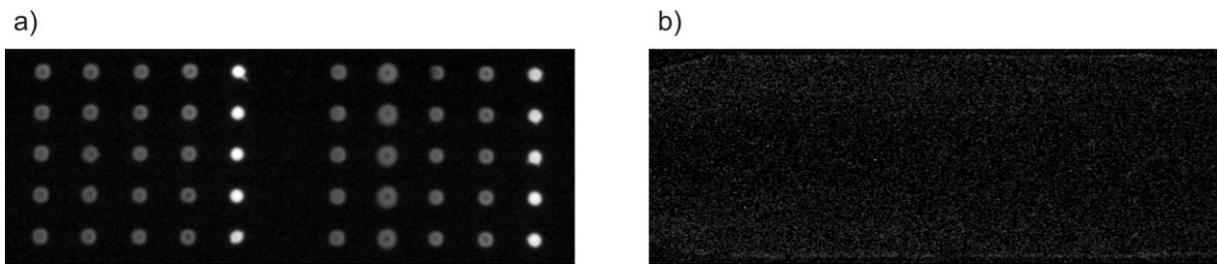


Abbildung 3.7: Messbilder der CCD-Kamera von Chipoberflächen nach Zugabe des Regenerationspuffers und nochmaliger Inkubation mit Detektionsantikörper und CL-Substraten. Der Regeneration wurde a) mit HCl-Glycin (pH 3) bzw. b) HCl-Glycin, SDS (pH 2) durchgeführt.

Daher wurde für die ersten Tests dieser Regenerationspuffer gewählt, um einen mit HEV-Antigenen belegten Mikroarray-Chip über fünf Messzyklen hinweg mit dem hochpositiven Serum H 03 zu beproben. Die Ergebnisse dieser Mehrfachmessung sind in Abbildung 3.8 wiedergegeben.

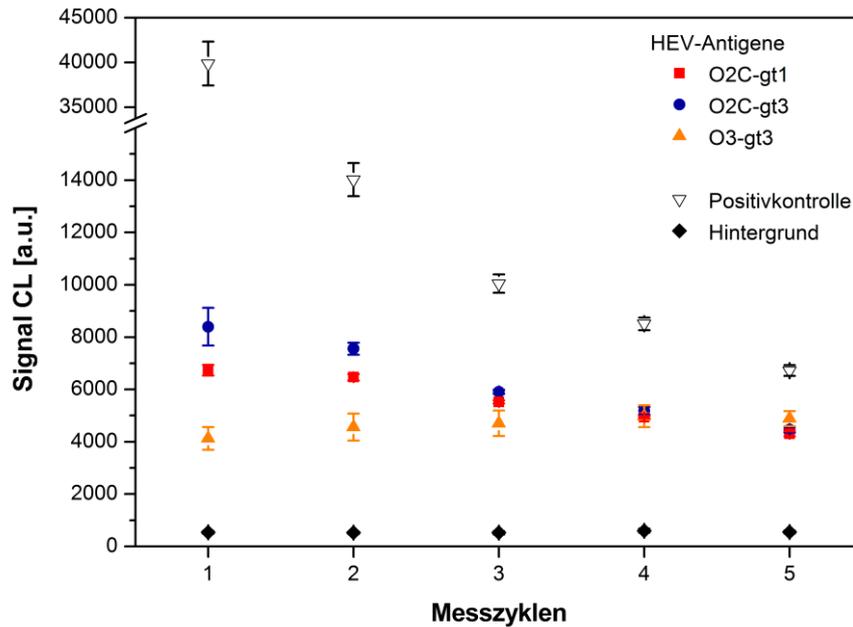


Abbildung 3.8: Darstellung des Signalverlaufs über 5 Regenerationszyklen für die HEV-Antigene O2C-gt1, O2C-gt3 und O3-gt3 nach Umpufferung der SDS-haltigen Stammlösung in Carbonatpuffer mit 10 mM DTT als Spottingpuffer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$).

Für diese Tests wurden die Antigene aus ihren SDS-haltigen Stammlösungen für das Spotting in Carbonatpuffer mit Zusatz von 10 mM DTT umpuffert.

Der Signalverlauf für die HEV-Antigene zeigt, dass alle Signaltrends einen deutlich geringeren Abbau der CL-Intensitäten aufweisen als der als Positivkontrolle verwendete Fängerantikörper Ziege anti-Schwein IgG. Bei diesem reduziert sich das gemessene Signal bereits nach fünf Zyklen auf nur noch 17 % des Ursprungssignals. Für die ORF2-basierten Antigene ist nach fünf Messzyklen noch ein verbleibendes Signal von 53 % für O2C-gt3 bzw. 63 % für O2C-gt1 messbar. Es ist somit ein Verlust von aktiven Bindungsstellen feststellbar, der bereits nach wenigen Wiederholungen zu einem deutlich verringerten Absolutsignal führt. Andererseits zeigt der Vergleich mit dem immobilisierten Antikörper, dass noch viele Antigen-Liganden einen Antigen-Antikörper-Komplex eingehen können. Im Gegensatz dazu lässt sich für das Antigen O3-gt3 kein Signalabbau ermitteln, hier liegt das CL-Signal der fünften Messung auf demselben Niveau wie zu Beginn. In Übereinstimmung mit den Aktivitätstests zeigt sich also dieses Antigen gegenüber denaturierenden Bedingungen sehr stabil und wäre für einen regenerierbaren Assay sehr geeignet. Wie bereits erwähnt, zeigte

sich jedoch in den Vergleichstests, dass ein Nachweis mit ORF3-basierten Antigenen aufgrund ihrer niedrigen Seroreaktivitäten keine aussagekräftigen Befunde für anti-HEV IgG liefern können. Aus den für die Antigene unterschiedlichen Signaltrends lässt sich jedoch ablesen, dass die Raumstruktur des jeweiligen Proteins einen wesentlichen Einfluss auf die Möglichkeit eines wiederwendbaren Protein-Chips hat. Da das Signal für O3-gt3 zumindest über die untersuchten fünf Messzyklen hinweg stabil bleibt, scheint das Assay-Programm grundsätzlich zu keiner Ablösung von Antigenen zu führen. Gleichzeitig unterbindet der gewählte Puffer die Anlagerung von Matrixbestandteilen, da der Signalhintergrund ebenfalls konstant bleibt.

Fazit

Die ersten Untersuchungen zur Regenerierbarkeit von rAg-Mikroarrays zeigen insgesamt, dass mit den gewählten Bedingungen ein deutlicher Signalabfall für die ORF2-basierten Antigene zu verzeichnen ist. Es scheint jedoch potentiell möglich, durch experimentelle Optimierung des Puffersystems eine Verringerung des Signalverlusts zu erreichen, da der Vergleich mit den Signalen des Fängerantikörpers ein deutlich besseres Signalverhalten für die rekombinanten Antigene erbringt.

Im Rahmen der Projektarbeit wurden die Prioritäten auf die Integration weiterer Antigene für die Entwicklung eines Multiplex-Nachweisverfahrens gelegt. Da für jeden Antigen-Antikörper-Komplex andere Regenerationsbedingungen optimal sein können, erschien es daher sinnvoll, zunächst mit Einmal-Chips zu arbeiten und anschließend die Regenerationsbedingungen mit Multiplex-Chips auszutesten. Für die zukünftige Optimierung der Regeneration können eine Vielzahl an Kombinationen aus den oben genannten Additiven und pH-Bedingungen getestet werden. Bei Verwendung von denaturierenden Zusätzen kann es darüber hinaus sinnvoll sein, nach der Zugabe des Regenerationspuffers den Chip mit einem Puffer ohne denaturierende Zusätze nachzubehandeln, um reversible Denaturierungen der Antigene rückgängig zu machen und dadurch die Aktivität wiederherzustellen. Nachdem für die gezeigten Tests alle Antigene in Carbonatpuffer ohne SDS vorlagen, kann sich bei Verwendung der SDS-haltigen Stammlösung für O2C-gt1 bzw. des MOPS-Puffers für O2C-gt3 das Signalverhalten unterscheiden. Auch dies gilt es zu überprüfen. Die Regeneration sollte dann über eine deutlich größere Zahl an Messzyklen getestet werden, da der Abbau der Signale nicht dem Verlauf der ersten Messzyklen entsprechen muss, sondern sich möglicherweise abflacht.

3.1.4 Test auf Lagerstabilität von HEV rAg-Mikroarrays

Sowohl für regenerierbare Mikroarrays als auch für nicht regenerierbare Mikroarrays stellt sich die Frage nach der Lagerstabilität. Während im Rahmen von Forschungsarbeiten die Herstellungs- und Messprozeduren so eingestellt werden können, dass alle Messungen mit frisch präparierten Chips durchgeführt werden können, ist es für eine vorgesehene Kommerzialisierung unabdingbar, Möglichkeiten für eine Lagerung der Mikroarray-Chips zu finden, welche dann über einen gewissen Zeitraum hinweg für Messungen verwendet werden können.

Dieses Kriterium stellt eine große Herausforderung für die Etablierung einer Immunoassay-Methode dar, welche im Rahmen dieser Arbeit lediglich mit wenigen Experimenten auf Basis der optimierten Oberflächenbehandlung (siehe Kapitel 3.2) getestet wurde.

Dazu wurden DAPEG-beschichtete Glaträger mit Epoxy-PEG aktiviert und in drei direkt aufeinanderfolgenden Spottingdurchgängen mit den gleichen Spottinglösungen der HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 belegt. Mit diesen inkubierten und inaktivierten rAg-Mikroarrays wurden Durchflusschips gefertigt, die unter verschiedenen Bedingungen für zwei bzw. acht Wochen gelagert wurden. Als Referenz wurden einige der Chips direkt nach Fertigung der Flusszellen gemessen (= Tag 0).

Als Lagerungsbedingungen für die Durchfluss-Chips wurde eine trockene Aufbewahrung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur, bei 4 °C bzw. bei -20 °C getestet. Um den Einfluss der drei Spotting-Chargen zu berücksichtigen, wurden dabei für jede Lagerbedingung Mikroarrays aus jeder Charge verwendet. Insgesamt wurden fünf Chips pro Bedingung untersucht.

Nach der entsprechenden Lagerungsdauer wurden die Chips mit Hilfe des seropositiven Serums H 12 am MCR 3 analysiert. Die Ergebnisse der Lagertests sind in Abbildung 3.9 für ausgewählte Spottinglösungen dargestellt.

Bei der Evaluation der erhaltenen CL-Signale kann festgestellt werden, dass erwartungsgemäß die Lagerung bei niedrigen Temperaturen vorteilhaft ist. Werden die gefertigten Flusszellen bei -20 °C bis zur Messung aufbewahrt, so resultieren unabhängig von der Lagerungsdauer die höchsten Signale.

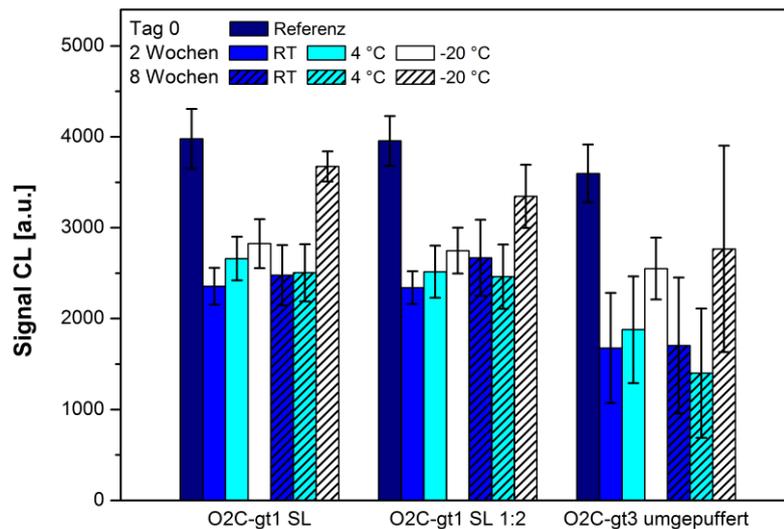


Abbildung 3.9: CL-Signale für rAg-Mikroarray-Chips nach Lagerung für 2 bzw. 8 Wochen bei verschiedenen Temperaturen und Messung mit Serum H 12. Für O2C-gt1 wurden sowohl die Stammlösung als auch deren 1:2-Verdünnung getestet, für O2C-gt3 wurden die Spots nach Umpufferung der Stammlösung ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Inter-Assay-Varianz von jeweils 5 Chips ($m = 10$).

Dabei zeigen allerdings bei Lagerung über zwei Wochen hinweg auch die eingefrorenen Chips Signalverluste für die Spots beider rekombinanter HEV-Antigene von ca. 30 %. Eine längere Lagerung scheint dagegen zu keiner weiteren Verringerung der Messsignale zu führen, was darauf hindeutet, dass die Prozesse, die zu einer geringeren Aktivität der Antigene führen, während der ersten Tage ablaufen. Nach einer Lagerung der Chips bei -20 °C über einen Zeitraum von acht Wochen werden für die Spots von O2C-gt1 sogar höhere Signale als nach zwei Wochen gemessen. Diese liegen nur ca. 10 % unter den CL-Signalen, welche für direkt nach Inkubation gemessene rAg-Chips resultieren. Um diesen Trend bestätigen zu können, müssen diese Experimente wiederholt werden. Auch für O2C-gt3 wird der geringste Signalabbau nach einer Lagerung bei -20 °C ermittelt, wobei für dieses Antigen insgesamt deutlich größere Chip-zu-Chip-Varianzen auftreten, die auf die in Kapitel 3.1.2 diskutierten Probleme mit der Antigenaktivität zurückgeführt werden können.

Neben der Signalintensität sollten auch die Auswirkungen der Lagerung auf die Spotqualität betrachtet werden. Für die verschiedenen Lagerungsbedingungen sind exemplarische Messbilder der CCD-Kamera mit Serum H 12 in Abbildung 3.10 gezeigt.

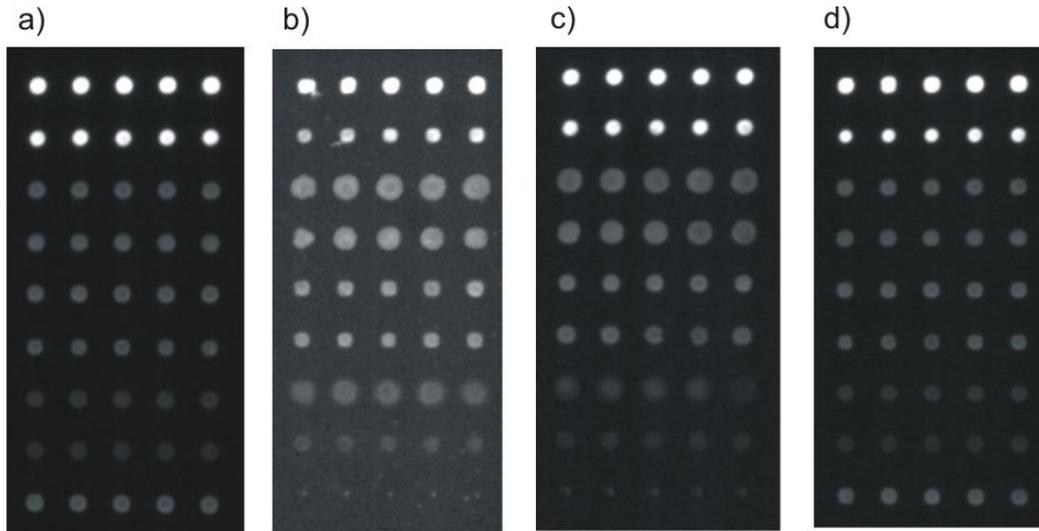


Abbildung 3.10: Bilder der CCD-Kamera für HEV rAg-Immuno-chips a) direkt nach Inkubation bzw. nach trockener Lagerung der Durchfluss-Chips über 8 Wochen bei b) Raumtemperatur, c) 4 °C oder d) -20 °C.

Bei Betrachtung der Messbilder kann bestätigt werden, dass das Einfrieren der Chips auch anhand der Beurteilung der Spotmorphologie die beste Lagerungsbedingung darstellt. Die Spots sind homogen und klar definiert und unterscheiden sich somit im Erscheinungsbild nicht von Spots, die mit frischen Chips erhalten werden. Bei höheren Temperaturen dagegen neigen die Spots mancher Antigenlösungen zum Aufspreiten und die Homogenität der Spots nimmt ab. Gleichzeitig werden höhere Hintergrundsignale gemessen, welche sich negativ auf das erzielte SNR auswirken.

Fazit

Als Zwischenergebnis dieser ersten Lagerungstests erweist sich die Lagerung bei -20 °C als eindeutig beste getestete Bedingung, welche keinen Einfluss auf die Spotformen hat und womit nur ein moderater Signalabbau verbunden ist. Alternativ sollte in Zukunft auf jeden Fall auch die Lagerung in Lösung untersucht werden. Hierzu können die Flusszellen der gekapselten Chips mit verschiedenen Pufferlösungen und stabilisierenden Zusätzen wie z.B. Mannit, Trehalose oder Milchpulver gefüllt werden und die Tests bei verschiedenen Lagerungstemperaturen durchgeführt werden. Eine Lyophilisierung der Antigen-Mikroarrays wäre ebenfalls eine denkbare Option, um lagerfähige Chips herzustellen.

3.2 Etablierung einer Oberflächenstrategie zur Immobilisierung rekombinanter Antigene auf modifizierten Glasoberflächen

Die Wahl einer geeigneten Oberflächenchemie ist die wichtigste Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung eines Immuno-chips. Die theoretischen Grundlagen und Möglichkeiten der Immobilisierung von Proteinen auf festen Phasen wurden in Kapitel 2.2.3.2 detailliert erläutert. Neben der Art der Kopplung hängt der Erfolg der Immobilisierung sowohl von den physiko-chemischen Eigenschaften der festen Phase, d.h. im Fall des Mikroarray-Chips des modifizierten planaren Glasträgers, als auch von den Eigenschaften der verwendeten Transferlösung für den Immobilisierungsprozess ab. Die geeignete Kombination aus Puffersystem und Oberflächenfunktionalisierung ist zum einen entscheidend für Form und Homogenität der resultierenden Spots, zum anderen wird darüber die Kopplungseffizienz und die Aktivität der immobilisierten Antigene definiert.

3.2.1 Herstellung geeigneter Mikroarray-Oberflächen

In dieser Arbeit wurde die adsorptive Bindung von rekombinanten HEV-Antigenen mit einer kovalenten Kopplungsstrategie verglichen. Für die Untersuchung der unspezifischen Adsorption der Antigene wurde als Oberfläche unmodifiziertes Polystyrol verwendet, da Polystyrol (PS) das etablierte Trägermaterial für adsorptionsbasierte Immunoassays in Form von Mikrotiterplatten-ELISAs darstellt. Darüber hinaus konnte aufgrund der Tatsache, dass der Projektpartner Mikrogen mit den in der Arbeit verwendeten Antigenen ein kommerzielles ELISA-Testsystem (*recomWell* HEV IgG/IgM) etablieren konnte, von einer grundsätzlichen Eignung dieser Oberflächenstrategie ausgegangen werden. Für die Versuche wurden Nunc PS-Oberflächen im klassischen Objektträgerformat von 75 x 25 mm verwendet.

Die Oberflächen- und Funktionalisierungsschemie der Glasoberflächen zur Immobilisierung der Proteine basiert auf den seit einigen Jahren am IWC etablierten Herstellungsprotokollen für die Modifizierung von Glasobjektträgern. Grundlage ist die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) als Zwischenschicht zwischen Oberfläche und Ligand. Die kovalente Bindung der Proteine kann dann über Einführung von funktionellen Linkern oder Aktivierungsreagenzien erfolgen.

Für die verwendeten Antigene war zunächst zu klären, welche Aminosäuren als Adressaten zur Verfügung stehen, um geeignete Oberflächentermini über die Modifizierung der Oberfläche zu gewährleisten.

Die von Mikrogen rekombinant hergestellten HEV-Antigene sind Proteine, die von Basensequenzen der ORF-Regionen des Virus-Genoms codiert werden. Dabei besitzt das verwendete ORF3-Antigen (O3) eine Aminosäuresequenz, die der vollständigen Codierung des 369 Basenpaare fassenden Leserahmens entspricht und insgesamt 123 Aminosäuren umfasst. Die beiden ORF2-basierten Antigene (O2) sind dagegen aus Teilsequenzen eines gekürzten Segments (*truncated* ORF2) des insgesamt 660 Aminosäuren umfassenden Kapsidproteins hergestellt, wobei die verwendeten Sequenzen aus Richtung des C-Terminus exprimiert wurden. Dabei weist nach Angaben von Mikrogen das Antigen O2C des Genotyps 3 eine Sequenz von 260 Aminosäuren, das Antigen O2C des Genotyps 1 eine Länge von 264 Aminosäuren auf. Um aus diesen Informationen eine Aussage über die in dieser Sequenz für eine Funktionalisierung nutzbaren Aminosäurereste zu erhalten, wurden diese Angaben mit Daten aus der Protein-Datenbank PDB und der veröffentlichten Expressionsmethode, derer sich Mikrogen bedient (Dremsek, 2012), am Beispiel von O2C-gt3 abgeglichen. Hierzu wurde als Grundlage die Aminosäuresequenz AA 335 – 608, die im Wesentlichen dem in der Arbeit verwendeten Antigen entsprechen sollte, herangezogen und mit den recherchierten Aminosäuren der Sequenz AA 129 – AA 606 verglichen. Dabei erbrachte die Analyse der relevanten Sequenz AA 335 – AA 606 (272 Aminosäuren), dass an den Stellen 351, 411, 423, 518, 534, 544 und 554 Lysine vorliegen. Die räumlichen Positionen der Lysinreste sind in Abbildung 3.11 anhand der berechneten 3D-Struktur auf Basis der Sequenz AA 129 – 606 von ORF2C-gt3 veranschaulicht. Aufgrund dieser insgesamt sieben Lysinreste, die für eine kovalente Bindung mit elektrophilen Kopplungspartnern zu Verfügung stehen, konnten die für die Herstellung von Antikörper-Mikroarrays etablierten Oberflächenaktivierungsmethoden, welche terminale Aminogruppen als Zielgruppen adressieren, als für den Anwendungszweck geeignet betrachtet werden.

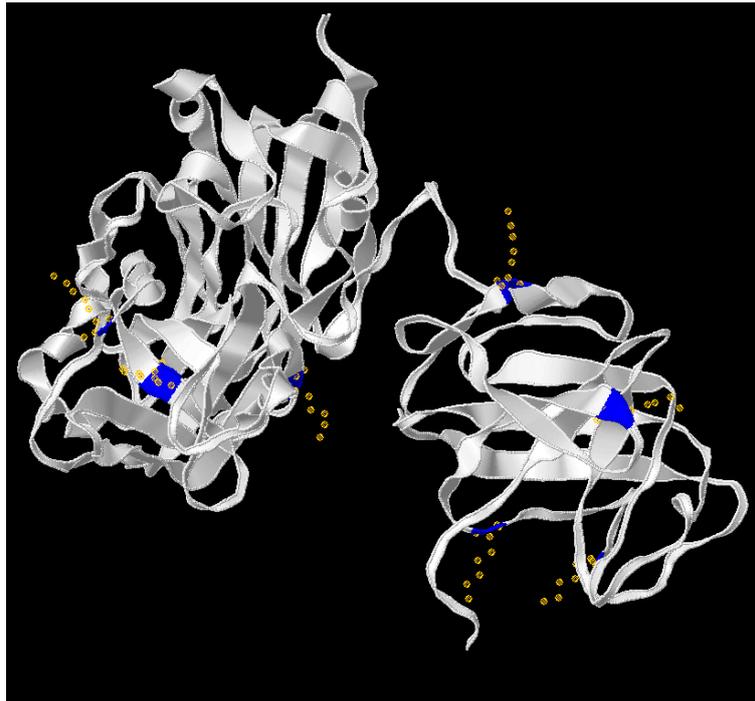


Abbildung 3.11: Raumstruktur von ORF2-gt3 mit Markierung der Seitengruppen (gelb) der enthaltenen Lysine (blau). Darstellung mit *Jmol* anhand der Daten zur Raumstruktur nach (Yamashita, 2009)..

Für die Entwicklung einer geeigneten Oberflächenstrategie wurden gebrauchsfertige kommerzielle PS-Objektträger (Nunc) für die Untersuchung einer unspezifischen adsorptiven Immobilisierung rekombinanter Antigene getestet. Die kovalente Bindung wurde mittels Epoxy- bzw. Aktivester-funktionalisierter PEG-Oberflächen untersucht.

Ausgehend von Glasobjektträgern mit den Abmessungen 76 x 26 x 1 mm wurden die Chipoberflächen in einem dreischrittigen manuellen Prozess gefertigt. Bei allen Beschichtungsreaktionen wurden immer zwei Glasträger übereinander gelegt, so dass sich die jeweilige Reaktionslösung zwischen den Träger befindet („Sandwich“). Diese Methodik bietet den Vorteil einer einseitigen Beschichtung und damit eines reduzierten Chemikalienverbrauchs.

Die Glasobjektträger wurden zunächst gründlich gereinigt und chemisch angeätzt, um organische und anorganische Verschmutzungen zu entfernen und anschließend eine einheitliche Hydroxyl-gesättigte Oberfläche zu generieren. Hierzu wurden die Träger zuerst mit Hellmanex behandelt und danach in ein 1:1-Gemisch von Methanol und Salzsäure sowie in konzentrierte Schwefelsäure getaucht. Die nachfolgende Silanisierung mit GOPTS wurde ohne Lösungsmittelzusatz bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von drei Stunden durchgeführt (Abbildung 3.12).

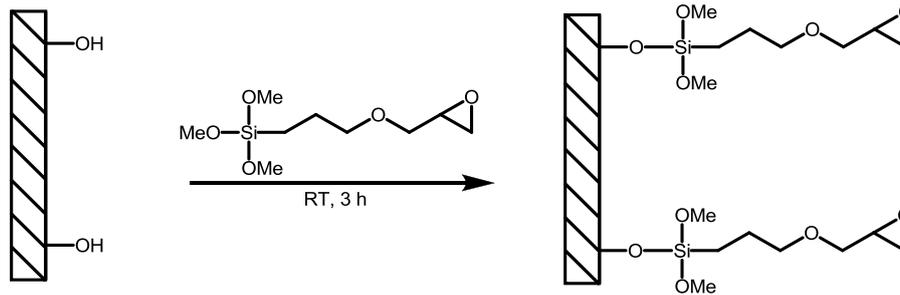


Abbildung 3.12: Silanisierung von Hydroxyl-terminierten Glasoberflächen mittels GOPTS.

Die Silanisierungsreaktion erwies sich für die Gesamtqualität der gefertigten Mikroarray-Oberflächen als Schlüsselschritt. Neben der im Vergleich zu früheren Protokollen längeren Reaktionsdauer führte die sorgfältige Durchführung der anschließenden Reinigungsschritte in Ethanol zu einer gleichbleibend hohen Qualität der Oberflächen, welche durch die in Kapitel 3.2.3 diskutierten hohen Signalstabilitäten der Antigen-Immunchips bestätigt werden konnte. Durch die Silanisierung mit GOPTS sollte idealerweise eine geordnete Monolage (SAM) erzeugt und damit exponierte, auf der Oberfläche gleichmäßig verteilte, Epoxygruppen eingeführt werden. Diese würden sich theoretisch für die kovalente Bindung von Proteinen eignen, erzeugen jedoch gleichzeitig eine stark hydrophobe Oberfläche. Gerade für den späteren Anwendungszweck des rAg-Mikroarrays zur Analyse von Serum ist diese Oberfläche aufgrund der zu erwartenden hohen unspezifischen Adsorption von Serumproteinen nicht geeignet. Der bekannte positive Effekt von PEG-Beschichtungen in Bezug auf die Vermeidung von unspezifischen Proteinablagerungen wurde durch die Einführung von langkettigen heterobisfunktionellen Diamino-PEG (DAPEG)-Einheiten in Form von Jeffamine D 2.000 (2 kDa) genutzt. Die vorliegenden beidseitigen terminalen Aminogruppen dienen einerseits zur kovalenten Kopplung des PEGs unter Ausbildung eines sekundären Amins an der Epoxy-funktionalisierten Silanschicht, andererseits nach Aktivierung für die kovalente Bindung der Antigene an der Oberfläche (siehe Abbildung 3.13).

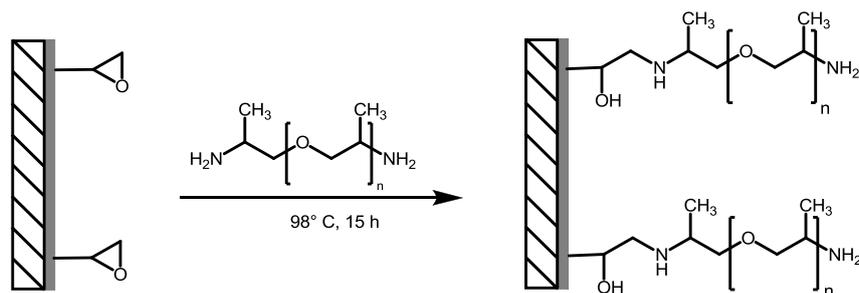


Abbildung 3.13: Beschichtung eines silanisierten Glaträgers mit DAPEG.

Die PEGylierung der silanisierten Glaträger wurde in der Polymerschmelze durchgeführt. Nach Reinigung und Trocknung der DAPEG-beschichteten Objektträger wurden diese unter Vakuum bis zur Verwendung über einen maximalen Zeitraum von vier Wochen gelagert.

Den für die Immobilisierung entscheidenden Schritt stellte die Aktivierung der Amino-PEG-Oberflächen dar. Hierfür wurden zum einen terminale Epoxygruppen mittels Polyethylenglycoldiglycidylether (Diepoxy-PEG) als Linker verwendet, zum anderen mit Hilfe von Di(*N*-succinimidyl)carbonat (DSC) ein Aktivester eingeführt (siehe Abbildung 3.14).

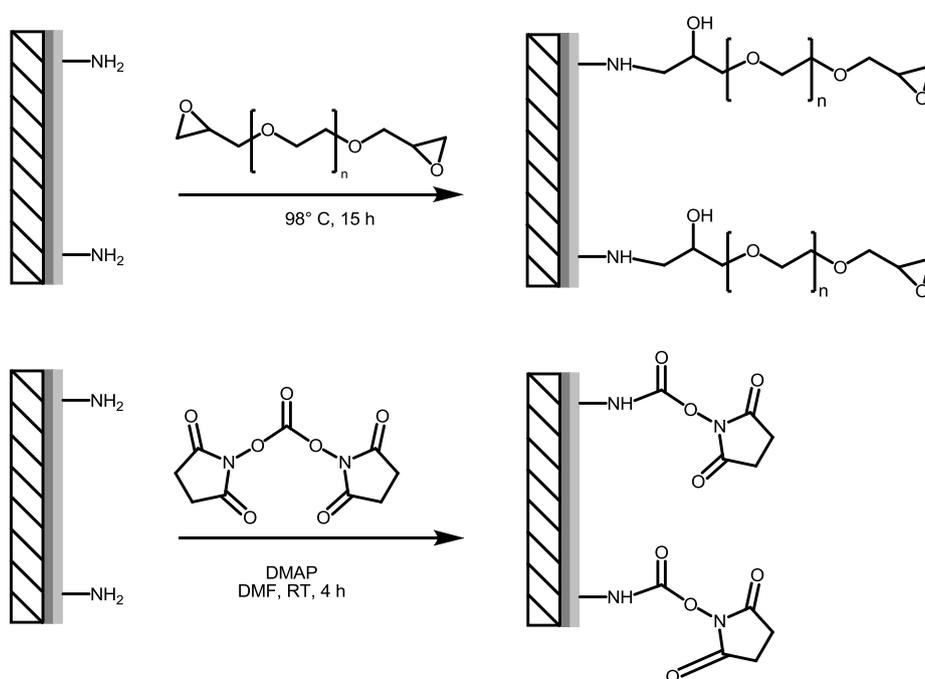


Abbildung 3.14 Aktivierung eines DAPEG-beschichteten Glaträgers mit a) Diepoxy-PEG bzw. b) DSC.

Bei beiden Aktivierungsmethoden werden homobisfunktionelle Linker eingesetzt, die zu einer Epoxy-PEG- bzw. NHS-Amid-Oberfläche führen, welche anschließend eine kovalente Bindung der Antigene über die primären Aminogruppen der Lysinreste erlauben.

3.2.2 Vergleich der adsorptiven und kovalenten Immobilisierung von HEV-Antigenen

Auf Basis der nach den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Aktivierungsprotokollen hergestellten Glaträger wurde die Effizienz und Homogenität der kovalenten Kopplung des rekombinanten HEV-Antigens O2C-gt1 untersucht und mit der unspezifischen Adsorption der Proteine auf Polystyrol-Oberflächen verglichen. Die Messungen erfolgten mit dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Messprogramm.

Für die Beurteilung der Signale wurde ein Realserum gewählt, das mit Hilfe des Line Immunoassay (LIA)-Tests *recomLine* HEV IgG/IgM als eindeutig positiv bezüglich des Titers für anti-HEV IgG eingestuft werden konnte (Serum H 12). Ein geeigneter Immunochip sollte für dieses Serum dementsprechend ein analytisch verwertbares Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (SNR), welches sich aus dem Vergleich der spezifischen Signale auf der Spotoberfläche mit dem unspezifischen Hintergrundsignal berechnen lässt, gewährleisten. Dafür muss zum einen eine hohe Kopplungsausbeute vorliegen, die Reaktivität und sterische Zugänglichkeit des Bindungsepitops des Antigens erhalten bleiben, sowie die unspezifische Adsorption von Proteinen an die Chipoberfläche minimiert werden.

Der Untersuchung des Hintergrundrauschens kommt für die Etablierung einer geeigneten Oberfläche für die Analyse von Schweineseren eine bedeutende Rolle zu, da im Vergleich zu Immunoassay-Anwendungen, bei welchen der Zielanalyt in Wasser- oder Puffermatrix vorliegt, der hohe Proteingehalt einen störenden Matrixeffekt mit sich bringen kann. Hier sind vor allem Serumbestandteile wie Albumine und Lysozyme zu nennen, die Seren zu einer komplexen Matrix machen. Diese Störkomponenten können neben einer Erhöhung des Hintergrundsignals auch die Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes behindern, was sich negativ auf die spezifischen Signale auswirken kann (Tate, 2004).

3.2.2.1 Vorversuche zur Etablierung eines einheitlichen Inaktivierungsprotokolls

Nachdem in den Vortests als Standardoberfläche nur Epoxy-PEG verwendet wurde, musste für die beiden alternativen Oberflächen getestet werden, wie diese bezüglich der Hintergrundsignale behandelt werden sollten. Die freien Epoxygruppen der Epoxy-PEG-Oberflächen wurden in den Vortests analog zum Nachbehandlungsprotokoll für Hapten-Mikroarrays mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) chemisch inaktiviert. Dazu wurden die Chips für 15 Minuten im Ultraschallbad in einer Lösung von 1 M Tris (pH 8,5, eingestellt mit konzentrierter Salzsäure) behandelt.

Für die NHS-Amid-Oberfläche konnte aufgrund der Erfahrungen am IWC mit Antikörper-Mikroarrays davon ausgegangen werden, dass eine Sättigung der Oberfläche (*blocking*) mit einer Proteinlösung zumindest die unspezifische Anlagerung von Detektionsantikörpern effektiv unterbindet. Hierfür wurden die inkubierten Antikörper-Mikroarrays für vier Stunden in eine 2 %-ige Casein-Lösung in PBS (Blockingpuffer III) gelegt. Dieses Protokoll wurde für die ersten Versuche übernommen.

Für die Immobilisierung wurde das HEV-Antigen O2C-gt1 in einer Stammlösung eingesetzt, in der das Antigen in einem MOPS-Puffersystem gelöst und mit den Additiven DTE (10 mM) und SDS (0,05 % w/v) versetzt vorlag.

Für die Messungen wurde das Serum H 12 in einer Verdünnung von 1:10 in PBST verwendet und damit in einer geringeren Verdünnungsstufe als in den Referenz-Immunoassays (1+100-Verdünnung) getestet, um das in den Vortests gemessene niedrige Signal zu erhöhen.

Zum direkten Vergleich wurden auch Epoxy-PEG-Oberflächen, die mit Tris nachbehandelt worden waren, untersucht.

Es wurden die Signale des Antigens und der Negativkontrolle (Puffer), welche für die Bestimmung des Hintergrundsignals diente, ausgewertet. Für O2C-gt1 ergaben sich dabei Signale für Epoxy-PEG im Bereich von 3.000 a.u., die NHS-Amid-PEG-Oberfläche zeigte Signale von ca. 3.700 a.u.. Das Hintergrundsignal betrug für beide Oberflächenvarianten ca. 650 a.u.. Wurden Mikroarray-Chips bei Durchführung des kompletten Assays mit Laufpuffer statt Serum als Probe inkubiert, ergaben sich dagegen CL-Signale im Bereich von lediglich 100 a.u.. Aus diesem mit beiden Funktionalisierungen deutlichen Unterschied des Hintergrundsignals kann ein deutlicher Matrixeffekt des Serums geschlussfolgert werden.

Gleichzeitig lagen sowohl die Absolutsignale als auch insbesondere das sich ergebende SNR von ca. 5:1 in einem nicht zufriedenstellenden Bereich.

Da bisher keine Erfahrungswerte über das spezifische und unspezifische Adsorptionsverhalten der Polystyrol-Oberflächen vorlagen, wurde darüber hinaus das CL-Signal eines nicht mit Blockingpuffer behandelten PS-Mikroarrays nach Ablauf eines kompletten Assays mit Serumprobe bzw. nach Zugabe nur des Detektionsantikörpers ermittelt (siehe Abbildung 3.15).

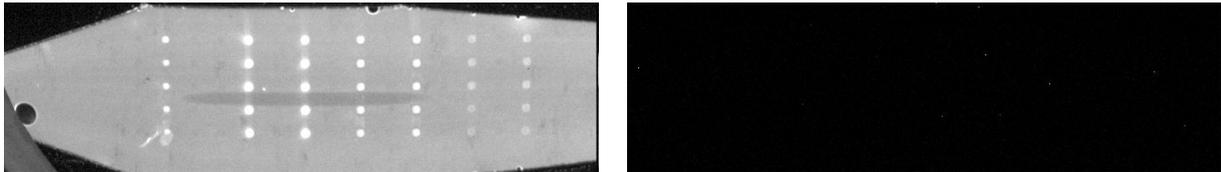


Abbildung 3.15: Auslesung eines Immunochips auf Basis einer PS-Oberfläche nach komplettem Assay (links) bzw. nach Zugabe von Detektionsantikörper und CL-Substraten (rechts).

Hier zeigte sich, dass auch für die PS-Oberflächen eine Inaktivierung der Oberfläche erforderlich ist, um den durch die Serumprobe hervorgerufenen hohen Signalhintergrund zu reduzieren. Als Zielstellung wurde daher die Erhöhung des SNR für die Messung von Seren in einer Standardverdünnung von 1+100 in PBST definiert.

3.2.2.2 Vergleich von Polystyrol-, Epoxy-PEG- und NHS-Amid-Mikroarrays

Um eine leichtere Vergleichbarkeit der Oberflächenvarianten zu erreichen, bestand der erste Schritt darin, das Protokoll der Chip-Nachbehandlung zu vereinheitlichen. Hierfür bot es sich an, die chemische kovalente Inaktivierung der freien reaktiven Gruppen mittels Tris-Molekülen mit der adsorptiven Absättigung der Oberfläche durch Proteine, wie es für NHS-Amid mit Hilfe von Casein durchgeführt wurde, zu kombinieren. Da in der Literatur häufig bessere Resultate hinsichtlich der Minimierung von unspezifischen Bindungen durch Verwendung von BSA beschrieben sind (Jeyachandran, 2010), wurde als Blockinglösung 1 % BSA in PBS getestet. Das neue Inaktivierungsprotokoll bestand dementsprechend aus einer 15-minütigen Behandlung der Mikroarrays mit Tris-Puffer im Ultraschallbad, gefolgt von einem Tauchbad in BSA-Lösung für eine Stunde unter leichtem Schütteln.

Für Versuche unter diesen Bedingungen wurden mehrere Mikroarray-Chips pro Oberflächenvariante verwendet und mittels Kontaktdruck mit den Antigenen belegt. Die Beurteilung der Immobilisierungsausbeute erfolgte durch Inkubation der Immunochips mit

der Serumprobe H 12 unter Verwendung des unter Kapitel 3.1.1 beschriebenen Messprotokolls. Aufgrund der genannten Probleme bezüglich der Stabilität des Antigens O2C-gt3 wurden ausschließlich die Daten des O2C-gt1 für die Beurteilung der Immobilisierungsqualität herangezogen. Für O2C-gt1 wurde die Stammlösung verwendet, in welcher das Antigen in einem MOPS-Puffersystem gelöst und mit den Additiven DTE (10 mM) und SDS (0,05 % w/v) versetzt vorlag. Es wurde zum einen die Stammlösung (1,06 mg/mL) direkt für den Spottingprozess eingesetzt, zum anderen wurde diese Stammlösung auf ca. das Vierfache der Ursprungskonzentration mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert, indem 100 µL Stammlösung auf das minimal erreichbare Rückstandsvolumen von ca. 25 µL eingeeengt wurde. Aufgrund der resultierenden stark schwankenden Messwerte war es nicht möglich, den tatsächlichen Konzentrationsfaktor unter Berücksichtigung von Verlusten während der Zentrifugation mittels Nanophotometer genauer zu bestimmen.

Diese beiden Lösungen wurden in einem Spottingdurchgang auf jeweils drei Chips der drei Oberflächenvarianten übertragen und alle Mikroarrays wurden über Nacht bei 25 °C und 50 % inkubiert. Die Träger wurden zunächst für 15 Minuten in Blockingpuffer I (1 M Tris-HCl, pH 8,5) im Ultraschallbad behandelt und anschließend für eine Stunde in einer 1 %-igen BSA-Lösung in PBS (Blockingpuffer IV) unter Schütteln inkubiert. Nach diesem für alle Oberflächenvarianten identischen Inaktivierungs- und Absättigungsprotokoll wurden die erhaltenen CL-Signale für das HEV-Antigen O2C-gt1, die Positivkontrolle Ziege anti-Schwein IgG (0,5 mg/mL) und den Signalhintergrund (Spots der Negativkontrolle) analysiert. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 3.16 für die drei untersuchten Oberflächenfunktionalisierungen dargestellt.

Die ermittelten CL-Signale lassen Schlussfolgerungen bezüglich verschiedener Parameter zu. Die wichtigste Aussage ist dabei die absolute Intensität der Signale für O2C-gt1 im Fall einer kovalenten bzw. adsorptiven Immobilisierungsstrategie. Für alle Oberflächenvarianten ist hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden getesteten Antigen-Konzentrationen messbar, so dass die Aufkonzentrierung der Stammlösung keine Verbesserung des Signalverhaltens mit sich bringt. Der Vergleich der Signale, die mit der Stammlösung von O2C-gt1 erzielt wurden, erbringt für die funktionalisierten PEG-Oberflächen signifikant höhere Intensitäten als für die PS-Mikroarrays. Noch deutlicher zeigt sich dieser Trend bei Vergleich der Signale für die Positivkontrolle. Die Absolutsignale für die drei Oberflächenvarianten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

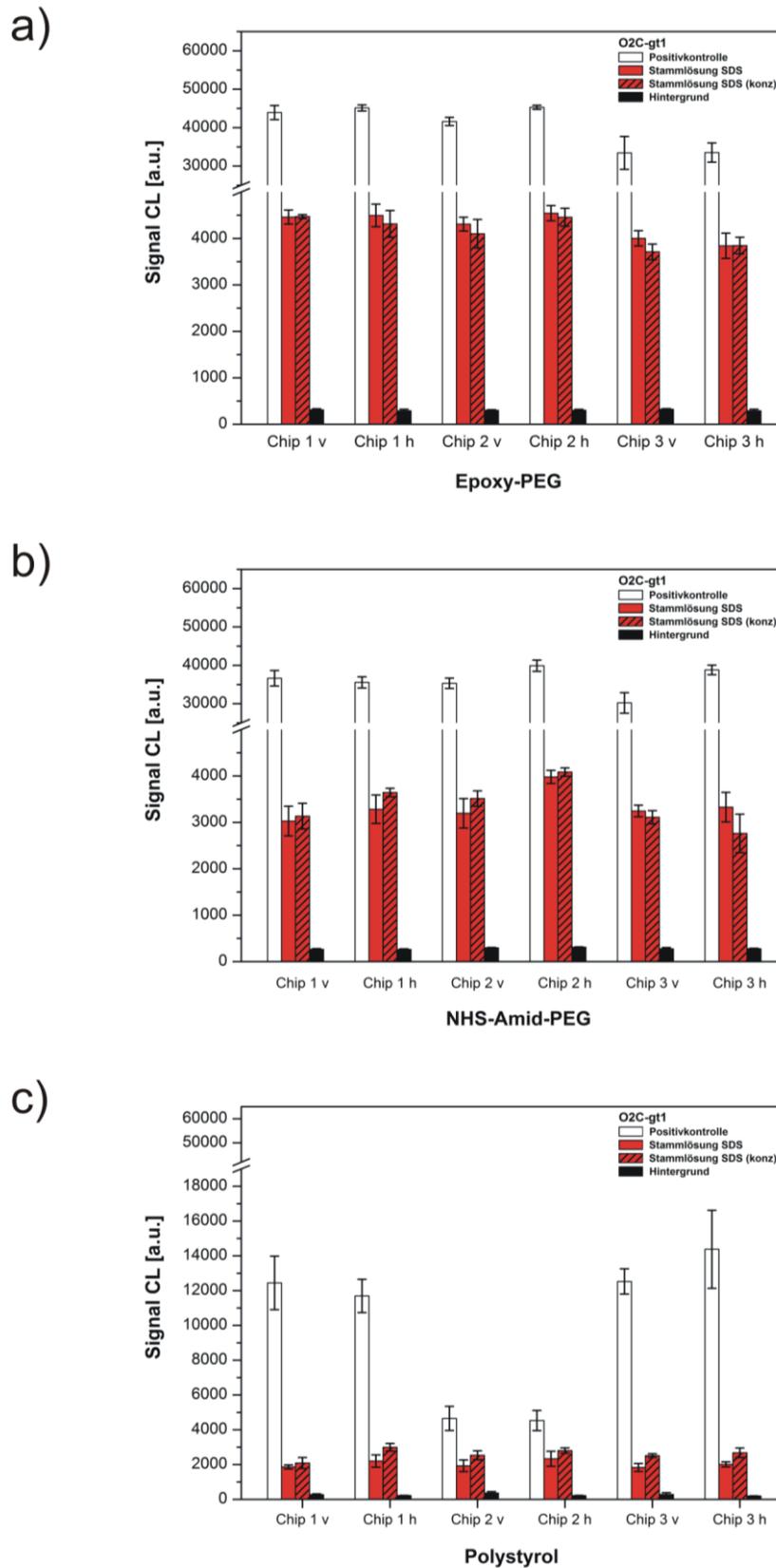


Abbildung 3.16: Vergleich der CL-Signale für HEV O2C-gt1 für die Oberflächenfunktionalisierung mit a) Epoxy-PEG, b) NHS-Amid-PEG bzw. c) Polystyrol.

Tabelle 3.2: Darstellung der CL-Signale für Positivkontrolle, HEV O2C-gt1 und Hintergrund in Abhängigkeit von der Oberflächenvariante.

| | Positivkontrolle | | HEV O2C-gt1 | | Hintergrund | |
|--------------|---------------------------|-------|---------------------------|-----|---------------------------|----|
| Oberfläche | MW \pm 1 s [a.u.] (n=6) | | MW \pm 1 s [a.u.] (n=6) | | MW \pm 1 s [a.u.] (n=6) | |
| Epoxy-PEG | 40.486 | 5.585 | 4.275 | 289 | 307 | 13 |
| NHS-Amid-PEG | 36.071 | 3.394 | 3.344 | 328 | 281 | 19 |
| Polystyrol | 10.039 | 4.310 | 2.030 | 198 | 259 | 61 |

Die deutlich höheren Signale, die mit den PEG-Oberflächen erzielt werden können, sprechen für eine bessere Kopplungseffizienz auf Basis der kovalenten Bindung von Proteinen über ihre Amino-Termini. Die um mehr als den Faktor drei höheren Signale für den kovalent immobilisierten Kontrollantikörper unterstützen die Hypothese einer besseren Kopplungsausbeute für Proteine mittels kovalenter Bindung. Als Grund für diesen Befund muss neben einer geringeren Kopplungseffizienz bei der passiven Beschichtung auch das Assay-Prinzip berücksichtigt werden. Da der Mikroarray-Chip in einem Durchflusssystem ausgelesen wird, können die mit hohen Flussraten durchgeführten Waschschriffe nach Reagenzienzugabe zu einem Auswaschen der lediglich physikalisch gebundenen Proteine führen und damit die Zahl der für eine abschließende Auslesung zur Verfügung stehenden gebundenen Detektionsantikörper reduzieren. Daneben können im Falle der hydrophoben PS-Oberfläche auch Denaturierungseffekte aufgrund hydrophober Wechselwirkungen einen Erklärungsansatz für die dort niedrigeren Signale liefern (Kusnezow, 2003 a).

Bei Betrachtung der CL-Signale für die Epoxy-PEG- und die NHS-Amid-PEG-Chips muss die für eine statistisch eindeutige Aussage geringe Anzahl an Messungen berücksichtigt werden. Generell ist eine kovalente Anbindung der rekombinanten Antigene mit beiden Oberflächenvarianten möglich. Wie der Tabelle 3.2 entnommen werden kann, konnten mit den Epoxy-PEG-Mikroarrays im Mittel höhere Signalintensitäten für O2C-gt1 sowie für die Positivkontrolle gemessen werden. Die gemessenen Chip-zu-Chip-Varianzen ($CV_{\text{Inter-Assay}}$, $n = 6$) liegen für beide Varianten mit 6,8 % (Epoxy-PEG) bzw. 9,8 % (NHS-Amid) in einem zufriedenstellenden Bereich.

Da neben dem erreichbaren spezifischen Signal bei der Analyse von Serumproben auch das unspezifische Hintergrundrauschen berücksichtigt werden muss, wurden für die Evaluierung der Oberflächenqualität die in Tabelle 3.3 angegebenen SNR-Werte herangezogen. Hierbei wurde für jede gemessene Flusszelle das Signal der Protein-Spots auf das Hintergrundsignal

normiert und die erhaltenen Signalverhältnisse als gemittelt SNR für jede Oberflächenvariante angegeben.

Tabelle 3.3: Berechnete SNR-Werte für Positivkontrolle und HEV O2C-gt1 auf den getesteten Oberflächen.

| Oberfläche | <i>Positivkontrolle</i> | | <i>HEV O2C-gt1</i> | |
|--------------|-------------------------|---------|--------------------|---------|
| | SNR | CV [%] | SNR | CV [%] |
| Epoxy-PEG | 132,4 | 17,1 | 14,0 | 10,2 |
| NHS-Amid-PEG | 111,6 | 7,5 | 11,9 | 6,5 |
| Polystyrol | 41,6 | 52,3 | 8,2 | 31,6 |

Die Auswertung der SNR-Werte bestätigt, dass die kovalente Kopplungsstrategie gegenüber der adsorptiven Bindung deutlich zu bevorzugen ist, da die auf Polystyrol-Mikroarrays erzielten SNR-Werte deutlich geringer und mit wesentlich höheren Streuungen behaftet sind. Die mit Epoxy-PEG beschichteten Glasoberflächen sind aufgrund der höchsten SNR-Werte für Antigen und Kontrollantikörper grundsätzlich am besten für die Immobilisierung der rekombinanten Antigene geeignet.

Ein weiteres Kriterium für die Wahl der Oberfläche war auch die Morphologie der Antigen-Spots auf den verschiedenen Oberflächen. Dazu wurde das optische Erscheinungsbild der Spots und die Spot-zu-Spot-Varianz ($CV_{\text{Intra-Assay}}$, $m = 5$) beurteilt. In Abbildung 3.17 sind exemplarisch die jeweils fünf Replikat-Spots für O2C-gt1 auf den drei Oberflächentypen gezeigt.

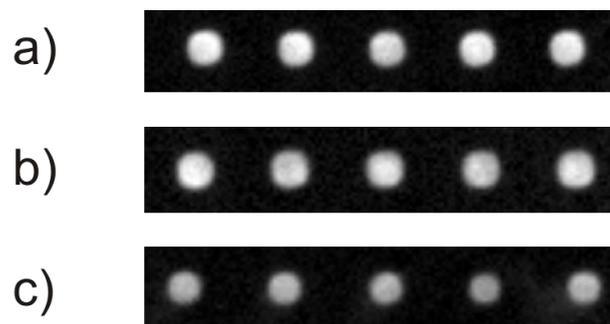


Abbildung 3.17: Replikat-Spots für O2C-gt1 nach Immobilisierung auf a) Epoxy-PEG, b) NHS-Amid-PEG und c) Polystyrol.

Bei optischer Betrachtung lässt sich feststellen, dass die Spots auf der Polystyrol-Oberfläche neben ihrer geringeren Signalintensität einen etwas geringeren Durchmesser (ca. 350 µm) aufweisen und zum Teil keine scharfe Abgrenzung der Spotflächen von der Umgebung erreicht wird. Die Immobilisierung des O2C-gt1-Antigens auf den PEG-Oberflächen gewährleistet dagegen kreisrunde Spots mit einem Durchmesser von ca. 500 µm und einer homogenen Signalverteilung. Die ermittelten Intra-Assay-Varianzen in Bezug auf die getesteten je sechs Flusszellen ergeben eine Streuung von lediglich 4,5 % für Epoxy-PEG und 7,8 % für NHS-Amid-PEG.

Insgesamt lieferten somit rAg-Mikroarrays auf Basis von Epoxy-PEG-Oberflächen die besten Ergebnisse, so dass diese Oberflächenvariante für die weiteren Experimente ausgewählt wurde.

3.2.2.3 Optimierung der Oberflächenbehandlung der rAg-Mikroarray-Chips

Neben den Rückschlüssen für die Auswahl der besten Oberflächenfunktionalisierung konnte aus den in Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen Tests eine weitere bedeutende Erkenntnis für die Nachbehandlung der Antigen-Mikroarrays gewonnen werden. Im Unterschied zu der Vorgehensweise in den unter Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Vorversuchen wurden die Mikroarrays nach der Inkubation mit Tris und BSA behandelt. Bei Vergleich der anschließend erhaltenen Signalintensitäten konnte festgestellt werden, dass die nach dem neuen Inaktivierungsprotokoll zusätzlich mit BSA behandelten Epoxy-PEG- und NHS-Amid-PEG-Mikroarrays nach Inkubation mit Serum H 12 in einer 1+100-Verdünnung für O2C-gt1 Signale lieferten, die im Bereich der zuvor mit einer 1:10-Verdünnung von Serum H 12 erzielten Signalintensitäten lagen. Da zugleich aufgrund der höheren Verdünnung der Serumproben das Hintergrundsignal auf die Hälfte reduziert werden konnte, erhöhten sich durch die Umstellung der Probenvorbereitung und der Chip-Nachbehandlung die erreichbaren SNR-Werte für den Nachweis von anti-HEV IgG auf Epoxy-PEG-Mikroarrays mittels O2C-gt1 von ca. 5:1 auf Werte von deutlich über 10:1.

Diese Verbesserung des SNR war für die Etablierung einer nachweisstarken Chip-basierten Nachweismethode von großer Bedeutung und stellte ein Schlüsselergebnis in der Entwicklung einer Standardmethode zur Herstellung von Antigen-Mikroarrays dar. Die Begründung für die Erhöhung der CL-Signale bei Verwendung von BSA in der Blockinglösung liegt einerseits vermutlich in einer Erhöhung der Bindungseffizienz durch Anwesenheit von BSA. Ein

positiver Effekt von BSA auf die Antikörper-Aktivität ist für ELISAs auf Basis immobilisierter Fängerantikörper bekannt und könnte bei der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes des Immunchips ebenfalls zum Tragen kommen. Ein wesentlicher Aspekt ist andererseits der Einfluss von BSA in Bezug auf die Anfälligkeit der rekombinanten Antigene gegenüber Denaturierung. Hier können durch einen stabilisierenden Effekt der BSA-Moleküle an der Oberfläche Denaturierungseffekte unterbunden und eine Rückfaltung der Antigene bewirkt werden (Dankwardt, 1998), wodurch die Aktivität der Antigene gewährleistet wird. Gleichzeitig reduziert die höhere Serumverdünnung den Anteil an störenden Matrixkomponenten in der untersuchten Probenlösung, welche zum Beispiel zur Maskierung der Epitope der Zielantikörper führen können.

Um möglichst optimale Ergebnisse zu erzielen, wurde das Protokoll der Chip-Nachbehandlung bezüglich der Vermeidung von Denaturierungseffekten in einigen Punkten abgeändert. Diese Änderungen wurden in Absprache mit dem Projektpartner Mikrogen vorgenommen, um die dort vorhandene Erfahrung im Umgang mit rekombinanten Antigenen bei der Entwicklung einer Standardprozedur aufzugreifen. Die Modifikationen betrafen die Zusammensetzungen der für die Inaktivierung und die Chip-Reinigung verwendeten Pufferlösungen. Dabei wurde der pH-Wert des Tris-Puffers von zuvor 8,5 auf 7,8 abgesenkt und der Puffer zusätzlich mit 150 mM Natriumchlorid versetzt. Statt der Behandlung im Ultraschallbad wurden die Chips unter leichter Schüttelbewegung für 15 Minuten geblockt. Für den zweiten Blockingschritt wurde dem bisher verwendeten PBS-Puffer 0,05 % (v/v) Tween-20 zugegeben und die Oberfläche folglich mit Proteinen und Polysorbaten gesättigt. Die Behandlungszeit der Chips in PBST wurde auf 30 Minuten reduziert. Die abschließenden Reinigungsschritte wurden mit PBST durchgeführt, um die Antigen-Spots in einer gepufferten Umgebung zu belassen.

Fazit

Die Untersuchung der Immobilisierungsbedingungen ergab, dass die kovalente Kopplungsstrategie für die rekombinanten Antigene gegenüber der ungerichteten Adsorption zu bevorzugen ist, wobei auf Basis von Epoxy-PEG-modifizierten Glasträgern (bei dreistündiger Silanisierung mit GOPTS) die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Nachbehandlung dieser Oberflächen mit Tris und zusätzlich BSA gewährleistet eine Stabilisierung der rAg-Liganden gegenüber Denaturierungseffekten und erhöht effektiv das SNR der CL-MIA-Messungen.

3.2.3 Untersuchung der Signalstabilität von Antigen-Immuno-chips

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von Mikroarray-Chips in der qualitativen und quantitativen Analytik ist die Stabilität der Messsignale. Nachdem die Entwicklung eines regenerierbaren Antigen-Mikroarrays aufgrund der Vortest-Ergebnisse (siehe Kapitel 3.1.3) kein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war, kam der Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der CL-Signale auf einzelnen Chips eine große Bedeutung zu. Es musste gewährleistet werden, dass jede einzelne Messung ein Signal liefert, das - bezogen auf wiederholte Messungen - in einem gewissen Toleranzbereich liegt. Nur dann ist es zulässig, aufgrund einer Einmal-Messung eine semiquantitative Einschätzung des Analyseergebnisses vorzunehmen. Bei der Einordnung der für Serumproben gemessenen Signale muss im Fall der veterinärmedizinischen Diagnostik generell berücksichtigt werden, dass hier zumeist keine quantitative Aussage auf Basis einer Kalibrierung mit Standards getroffen wird. Parameter wie die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) und die Lage des Testmittelpunktes der Kalibrierung in Bezug auf eine gesetzlich vorgeschriebene Höchstmenge des Zielanalyten (*maximum residue limit*, MRL) spielen in diesem Bereich eine untergeordnete Rolle. Für die in der Diagnostik häufig verwendeten qualitativen *Screening*-Tests liegt die Priorität bei der Methodenentwicklung dagegen in der Gewährleistung einer sicheren Aussage über das Vorhandensein des Zielanalyten in der Probe, die in Form eines Positiv- oder Negativ-Befunds getroffen werden kann und häufig über Vergleich mit Positiv- und Negativkontrollen bzw. Cut-Off-Kontrollen experimentell ermittelt wird. Dies setzt für einen nicht regenerierbaren Immuno-chip stabile Messsignale voraus, da im Unterschied zu einem kalibrierbaren Chip die Chip-zu-Chip-Varianzen ($CV_{\text{Inter-Assay}}$) der erzielten Absolutsignale nicht relativiert werden, sondern direkt in die Analyseergebnisse eingehen. Stark streuende Messsignale der nur einfach verwendeten Chips würden somit bei Mehrfachmessung einer Probe mit einer Analyt-Konzentration im Cut-Off-Bereich zu unterschiedlichen Befunden führen.

Analog zu den Experimenten zur Optimierung der Oberflächenchemie wurde die Stabilität der Messsignale der auf Epoxy-PEG-Mikroarrays basierenden Antigen-Immuno-chips mit dem unter Kapitel 3.1.1 beschriebenen Messprogramm analysiert und für die Messungen die Serumprobe H 12 für den Nachweis von anti-HEV IgG bzw. die Serumprobe Y 2 für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG verwendet.

3.2.3.1 Generelle Aspekte zur Beurteilung der Signalstabilitäten von rAg-Immuno-chips auf Basis von Durchfluss-Mikroarrays

Abweichungen in den ermittelten Signalen von Messungen mit Mikroarrays am MCR 3 können verschiedene Ursachen haben, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

Als Grundvoraussetzung für eine hohe Signalstabilität ist eine hohe Qualität der verwendeten Oberflächen zu gewährleisten. Hier mussten die vielen manuellen Schritte bei der Präparation der PEGylierten Glasträger soweit standardisiert werden, dass homogen beschichtete Oberflächen resultierten, die eine gleichmäßige Verteilung und Zugänglichkeit der terminalen Gruppen für die anschließende Kopplung der Rezeptoren ermöglichten.

Die Immobilisierung der Rezeptoren stellt im Bereich der Mikroarray-Technologie sowohl in Bezug auf die gewählten Bedingungen als auch hinsichtlich der technischen Realisierung eine Herausforderung dar, welche die Qualität der Ergebnisse entscheidend beeinflusst. Die damit verbundene Problematik im Fall der verwendeten rekombinanten Antigene wurde in Kapitel 3.1.2 diskutiert. Während für das HEV-Antigen O2C-gt1 nach Optimierung der Oberflächenchemie mit der SDS-haltigen Stammlösung gearbeitet werden konnte, war für das Antigen O2C-gt3 eine Reduzierung des SDS-Gehaltes für eine Reaktivität nach der Immobilisierung notwendig. Daher musste vor jedem Spottingvorgang die Antigen-Stammlösung von O2C-gt3 (20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,05 % SDS) mit Hilfe von Ultrazentrifugation entfernt und das Antigen in einem SDS-freien Puffer wiederaufgenommen werden. Dies wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifugation durchgeführt, indem 50 µL der Antigenlösung mit 450 µL des SDS-freien Spottingpuffers IV (20 mM MOPS, 10 mM DTT, 0,01 % Tween-20) verdünnt und in Amicon-Filtereinheiten zentrifugiert wurden. Der in der Filtereinheit verbleibende Rückstand von ca. 20 - 25 µL wurde durch Überkopfzentrifugation wiedergewonnen und für den Spottingprozess in eine Mikrotiterplatte überführt. Dabei wurde der SDS-Gehalt der Antigenlösung um den Faktor zehn reduziert und die Konzentration des Antigens durch die Einengung des Volumens ungefähr verdoppelt. Durch dieses Vorgehen konnte die Aktivität des Antigens wiederhergestellt und O2C-gt3 für den Nachweis von anti-HEV-IgG verwendet werden. Die Zentrifugation an sich ist jedoch generell mit Proteinverlusten verbunden, die sich auf das spätere Messsignal auswirken können. Darüber hinaus bringt der Verzicht auf SDS das Risiko einer Aggregation der Antigene mit sich, was zu weiteren Verlusten an aktiven, für die Bindung von Antikörpern zur Verfügung stehenden Rezeptoren führen kann. Da dieser Vorgang vor jedem Spottingvorgang durchgeführt wurde,

war eine Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit der auf dem Antigen O2C-gt3 basierenden anti-HEV-Messergebnisse zu erwarten.

Bei der technischen Realisierung der Immobilisierung wurde das Kontaktdruck-Verfahren angewendet. Diese Art des Auftragens durch direktes Absetzen der Spottinglösung auf der Oberfläche ist eine technisch relativ einfache und sichere Methode, birgt aber aufgrund der benötigten Zeit für den Vorgang (ca. drei Stunden für neun, mit je 180 Spots belegten Chips) das Risiko, dass sich leichte Änderungen in den Umgebungsbedingungen, d.h. Luftfeuchtigkeit und Temperatur, negativ auf die Spot-zu-Spot-Varianz und insbesondere die Aktivität der Antigene auswirken. Um solche Effekte zu vermeiden, werden bei der Herstellung von DNA- und Antikörper-Mikroarrays dem Spottingpuffer häufig Additive wie Glycerol, Trehalose, Sucrose oder Mannit zugesetzt, um ein definiertes Eintrocknen der Spots zu erreichen bzw. die Spots feucht zu halten und somit einer möglichen Denaturierung vorzubeugen (Dufva, 2005; Kusnezow, 2003 b). Auch Polyhydroxy-Materialien wie PEG wurden in kurzkettiger und damit wasserlöslicher Form erfolgreich in Spottinglösungen als Stabilisator für Protein-Mikroarrays getestet (Lee, 2002). Diese Strategie lässt sich für Lyophilisate leicht anwenden, da hier der Rezeptor direkt in einem maßgeschneiderten Spottingpuffer gelöst werden kann. Die in der Arbeit verwendeten Antigene lagen dagegen in kleinen Volumeneinheiten von 35 - 50 μL in Stammlösungen vor, so dass ein Versetzen dieser kleinen Volumina mit Additiven wenig praktikabel war, ohne entweder die Antigene vorher abzuzentrifugieren oder ihre Konzentration durch Verdünnung mit einer Additiv-Lösung deutlich zu reduzieren. Daher wurde auf einen Zusatz von stabilisierenden Reagenzien zunächst verzichtet.

Neben diesen Aspekten im Bereich der Herstellung der Antigen-Mikroarrays ist ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Signalstabilitäten das verwendete Durchfluss-Prinzip. Hier ist bei der Evaluation der erzielten Ergebnisse zu berücksichtigen, dass alle Assay-Schritte im kontinuierlichen Fluss durchgeführt werden, bei dem aufgrund der kurzen Verweildauer der immunochemischen Reagenzien im Sekundenbereich von keiner Einstellung des chemischen Gleichgewichts ausgegangen werden kann und somit der Assay einer größeren Schwankung unterliegt als ein stationärer Assay, bei dem Inkubationszeiten von mehreren Minuten bis Stunden üblich sind. Darüber hinaus muss bei der praktischen Umsetzung der einzelnen Assay-Schritte darauf geachtet werden, dass ein gleichmäßiger laminarer Fluss gewährleistet ist und zugleich Störungen von Luftblasen vermieden werden. Dies erfordert eine Optimierung des Messprogramms hinsichtlich dieser Punkte (siehe Kapitel 3.1.1).

Andererseits erlaubt die Ausleseplattform MCR 3 die automatische Durchführung aller Assay-Schritte und lässt bei idealer Abarbeitung der Programmbefehle keinen Spielraum für Abweichungen in der Analysendurchführung, wie sie bei manueller Assay-Abarbeitung auftreten können.

3.2.3.2 Bestimmung der optimalen HEV-Antigen-Konzentration

Nachdem eine Erhöhung der Spottingkonzentration für O2C-gt1 keine Verbesserung der Signale erbrachte (siehe Kapitel 3.2.2.2), wurden in einem weiteren Vorversuch auch geringere Antigen-Konzentrationen in Form einer Titration auf den Epoxy-PEG-Oberflächen getestet, um eine optimale Konzentration hinsichtlich der Signalintensität und -stabilität zu ermitteln. Hierfür wurden ausgehend von der O2C-gt1-Stammlösung (1,06 mg/mL) mit dem Puffer der Stammlösung 1:2-, 1:5- und 1:10-Verdünnungen hergestellt und diese Antigenlösungen für das Spotting verwendet.

In Abbildung 3.18 ist ein exemplarisches Messbild für diesen Versuch dargestellt. Bei der Diskussion der Ergebnisse dieses Tests muss berücksichtigt werden, dass hierfür noch nicht das optimierte Verfahren zur Chip-Nachbehandlung angewendet wurde, was sich gerade auf die Streuung der Absolutsignale auswirkt.

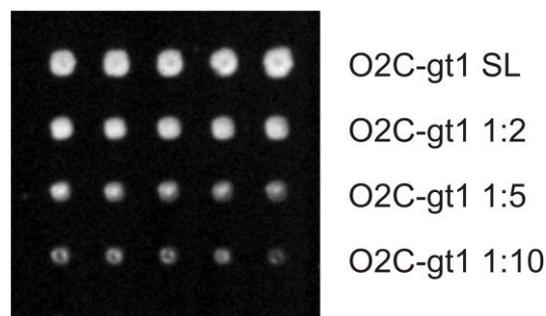


Abbildung 3.18: CL-Signale der Antigen-Spots in Abhängigkeit der Konzentration von O2C-gt1.

Bei optischer Betrachtung ist deutlich die Größenabhängigkeit der Spots von der Antigen-Konzentration sichtbar. Damit verbunden ist auch eine Signalabnahme bei höherer Verdünnung der Antigen-Stammlösung. Die starke Abhängigkeit der Spotgröße und Signalintensität von der gewählten Spottingkonzentration ist generell bei der Immobilisierung von Rezeptoren für Mikroarrays zu beobachten. Aufgrund der relativ geringen Ausgangskonzentration entsprechen die deutlich geringeren Signale bei einer 1:10-

Verdünnung der Stammlösung auf eine Antigen-Konzentration von ca. 100 µg/mL den Erwartungen. Auch die Homogenität der Helligkeitsverteilung auf einem Spot ist nur bei den beiden höchsten Konzentrationen gewährleistet.

Die erzielten CL-Signale und die jeweiligen Inter-Assay-Varianzen für die getesteten Konzentrationen für O2C-gt1 sind im Überblick in Tabelle 3.4 angegeben.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Titration des Antigens O2C-gt1, gemessen mit Serum H 12 (n = 14, m = 5).

| O2C-gt1 SL | | O2C-gt1 1:2 | | O2C-gt1 1:5 | | O2C-gt1 1:10 | |
|-------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|---------------------|--------|
| MW [a.u.] | CV [%] | MW [a.u.] | CV [%] | MW [a.u.] | CV [%] | MW [a.u.] | CV [%] |
| 4.006 | 18,9 | 3.760 | 12,2 | 2.971 | 16,8 | 1.563 | 32,2 |

Bei Vergleich der CL-Signale, die mit der Stammlösung des Antigens bzw. deren 1:2-Verdünnung erzielt wurden, lässt sich kein deutlicher Unterschied in den Absolutsignalen erkennen. Die Morphologie der Spots und die Inter-Assay-Varianz erbrachte ein besseres Signalverhalten für die verdünnte Lösung. Daher wurden für die weiteren Tests Mikroarrays hergestellt, welche mit dem HEV-Antigen O2C-gt1 in beiden Konzentrationsstufen beschichtet wurden, um den gefundenen Trend genauer zu untersuchen.

Für die Immobilisierung von O2C-gt3 wurde aus den Ergebnissen für O2C-gt1 gefolgert, dass eine möglichst hohe Antigen-Konzentration von Vorteil sein sollte. Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Gewährleistung der Stabilität und Aktivität des O2C-gt3-Antigens wurde dieses Antigen lediglich in der Konzentration der Pufferlösung, die nach dem Umpuffern der Stammlösung vorlag, getestet und keine weiteren Verdünnungsexperimente durchgeführt. Zum Vergleich wurde die SDS-haltige Stammlösung von O2C-gt3 (0,62 mg/mL) auf den Chip übertragen.

Für die weiteren Messungen wurde somit ein Design des HEV-Mikroarrays gewählt, welches zur Charakterisierung des HEV-Immuno-chips hinsichtlich auftretender Signaltrends auf einem Chip bzw. von Chip zu Chip den in Tabelle 3.5 dargestellten Aufbau besaß. Das gezeigte Chip-Design ist dabei in der vertikalen Reihenfolge des Spottings dargestellt.

Tabelle 3.5: Aufbau des Mikroarray-Chips basierend auf HEV-Antigenen.

| Belegung | |
|-----------------------|--|
| Negativkontrolle | |
| Positivkontrolle | |
| Negativkontrolle | |
| O2C-gt1 | |
| O2C-gt1 (1:2) | |
| O2C-gt1 | |
| O2C-gt1 (1:2) | |
| Negativkontrolle | |
| O2C-gt3 | |
| O2C-gt3 (umgepuffert) | |
| Negativkontrolle | |
| O2C-gt1 | |
| O2C-gt1 (1:2) | |
| O2C-gt1 | |
| O2C-gt1 (1:2) | |
| Positivkontrolle | |

Die Homogenität der Spots der Mikroarray-Chips, die nach dem optimierten Herstellungsprotokoll gefertigt wurden, kann aus der dreidimensionalen Darstellung der Signalintensitäten für den in Tabelle 3.5 dargestellten Messchip in Abbildung 3.19 nachvollzogen werden. Die Signale sind in dieser Darstellung eingefärbt, wobei die Farbskala von tiefblau für niedrige Signalintensitäten bis weiß für sehr hohe Signalintensitäten reicht.

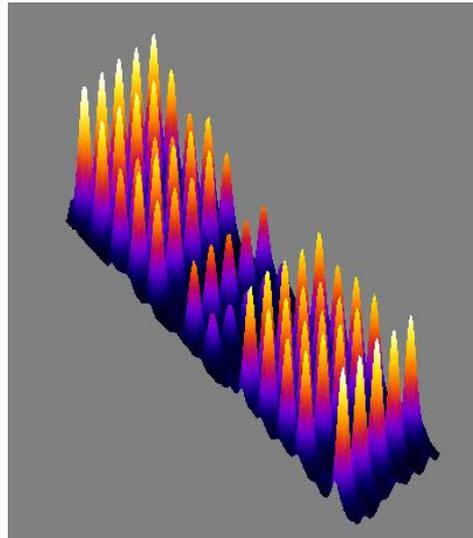


Abbildung 3.19: 3D-Darstellung (*ImageJ*) der Spots eines Messchips zum Nachweis von anti-HEV IgG.

Bezogen auf die Flussrichtung bei der Assay-Durchführung befinden sich die oben dargestellten Spots am Flusszellenausgang. Eine der Flussrichtung angepasste graphische Auftragung ist in Abbildung 3.20 gezeigt, in der die Ergebnisse eines Wiederholungstests mit sechs Chips gleichen Designs zusammengefasst sind.

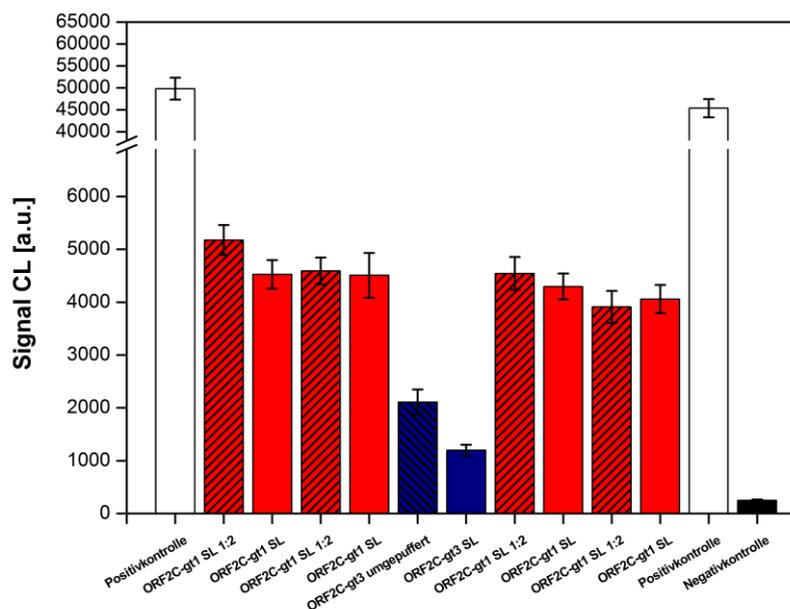


Abbildung 3.20: CL-Signale von HEV-Immuno-chips bei Auftragung der immobilisierten Antigenreihen in Flussrichtung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Inter-Assay-Varianz der mittleren Spotsignale (MW) aus der Messung von 6 Chips ($n = 12$).

Die Auswertung dieses Tests bestätigt die Erkenntnis, dass die Absolutsignale, die mit der Stammlösung bzw. der 1:2-Verdünnung von O2C-gt1 erzielt werden, bei Berücksichtigung der Standardabweichungen in einem sehr vergleichbaren Bereich liegen. Bei Vergleich der in x-Richtung über die Flusszelle verteilten Spottingreihen lässt sich der bei den Durchfluss-Assays generell auftretende Einfluss der Lage der Spots auf ihr CL-Signal zeigen. Dabei weisen Spots am Flusszelleneingang, die zuerst mit den Reagenzien in Kontakt kommen, stets ein etwas höheres Signal als die Spots in Richtung Flusszellenausgang auf. Dieser Effekt ist auch in Abbildung 3.20 sichtbar, der z.B. für die beiden am Eingang bzw. Ausgang platzierten Kontrollantikörper-Spotreihen zu einem Signalunterschied von ca. 9% führt. Als Konsequenz daraus ist in Bezug auf die Vergleichbarkeit von Messergebnissen auf Basis verschiedener Chips darauf zu achten, dass die für die Analyse verwendeten Spots möglichst die gleiche Position im Array einnehmen. Die Wiederholbarkeit, ausgedrückt in den eingezeichneten Fehlerbalken in Abbildung 3.20, lag für die nach dem optimierten Inaktivierungsprotokoll behandelten Mikroarray-Chips mit $CV_{\text{Inter-Assay}}$ -Werten zwischen 5 % und 10 % in einem sehr zufriedenstellenden Bereich, ohne dass ein Zusammenhang zwischen den CV-Werten und der Position der Spots festgestellt werden konnte. Dies unterstreicht die Eignung des optimierten Verfahrens für die weiteren analytischen Untersuchungen.

Die Signale für das Antigen O2C-gt3 lagen deutlich unter den Signalen für Antigen O2C-gt1. Gleichzeitig bestätigte der direkte Vergleich der Signale, die mit der SDS-haltigen Stammlösung bzw. der SDS-freien Pufferlösung erreicht werden konnten, die Notwendigkeit des Umpufferns, um ein für Screening-Zwecke nutzbares SNR für O2C-gt3 zu gewährleisten. Die Reduktion des SDS-Gehaltes im Spottingpuffer führte in diesem Test zu fast einer Verdopplung des Absolutsignals und dementsprechend auch zu einer Erhöhung des SNR von ca. 5:1 auf ca. 9:1.

3.2.4.3 Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen mit optimierten rAg-Immuno-chips am MCR 3

Für den Test der Signalstabilität wurden Antigen-Mikroarrays mit den beiden rekombinanten HEV-Antigenen O2C-gt1 und O2C-gt3 hergestellt und die Signalstabilitäten hinsichtlich der Wiederholpräzision ($CV_{\text{Intra-Day}}$) und der Reproduzierbarkeit, d.h. der Vergleichspräzision ($CV_{\text{Inter-Day}}$) der Messungen beurteilt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Antigen-Mikroarrays mit dem rekombinanten Antigen YopD hergestellt, so dass auch Ergebnisse für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG zur Verfügung standen.

Messungen mit HEV-Antigenen

Für den Nachweis von HEV-Antikörpern wurden die beiden ORF2-basierten Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 ausgewählt, das ORF3-basierte Antigen O3-gt3 wurde aufgrund seiner im LIA ermittelten geringen Seroreaktivität nicht auf dem Immuno-chip integriert.

Da in den Vortests die Absolutsignale für die Stammlösung und die 1:2-Verdünnung des Antigens O2C-gt1 sehr vergleichbar waren, wurden beide Konzentrationsstufen immobilisiert und vergleichend ausgewertet. Im Fall des Antigens O2C-gt3 wurden die Spotsignale der umgepufferten Stammlösung im Vergleich zur ursprünglichen SDS-haltigen Stammlösung evaluiert. Es wurden Messungen an drei verschiedenen Messtagen durchgeführt.

In Kapitel 3.2.3.1 wurden grundsätzliche Einflussfaktoren auf die zu erwartende Reproduzierbarkeit der Messdaten von Durchfluss-Mikroarrays diskutiert. Um neben der Wiederhol- und der Reproduzierbarkeit des Durchfluss-Immunoassays auch die Chip-Herstellung miteinzubeziehen, wurden für die Mehrtagesstudie unterschiedliche Chargen von DAPEG-belegten Glasoberflächen verwendet und direkt vor der Immobilisierung der Antigene mit Epoxy-PEG belegt. Somit wurden Schwankungen der Oberflächenqualität berücksichtigt. Der Spottingvorgang wurde ebenfalls an jedem Versuchstag neu durchgeführt. Dies ist hinsichtlich des dafür jedes Mal notwendigen Umpufferns der Stammlösung des Antigens O2C-gt3 von großer Bedeutung. Alle Messungen wurden mit der eindeutig anti-HEV IgG-positiven Probe H 12 in einer 1+100-Verdünnung mit PBST durchgeführt. Das vorgeschaltete Serenscreening mit Hilfe des adaptierten LIA-Tests *recomLine* HEV IgG/IgM (Mikrogen) hatte aufgrund der bekannten vorliegenden Kreuzreaktivität von O2C-gt1 mit Antikörpern gegen Genotyp 3 (Wacheck, 2012) für beide Antigene Signale gezeigt, so dass auch für den Immuno-chip Signale für O2C-gt1 und O2C-gt3 zu erwarten waren.

In Abbildung 3.21 sind die resultierenden Signalintensitäten für O2C-gt1 dargestellt. Neben den Mittelwerten (MW) und der Spot-zu-Spot-Varianz ($CV_{\text{Intra-Assay}}$, $m = 5$) ist hier zusätzlich der aus den Daten berechnete Erwartungsbereich eingezeichnet. Der Erwartungsbereich erlaubt eine Aussage über den Schwankungsbereich einer zukünftigen Messung unter gleichen Bedingungen, bezogen auf eine bestimmte statistische Sicherheit P . Für diese wurde mit dem standardmäßig in der instrumentellen Analytik verwendeten Wert von 95 % gerechnet, d.h. es wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von einem aus zwanzig Messwerten toleriert.

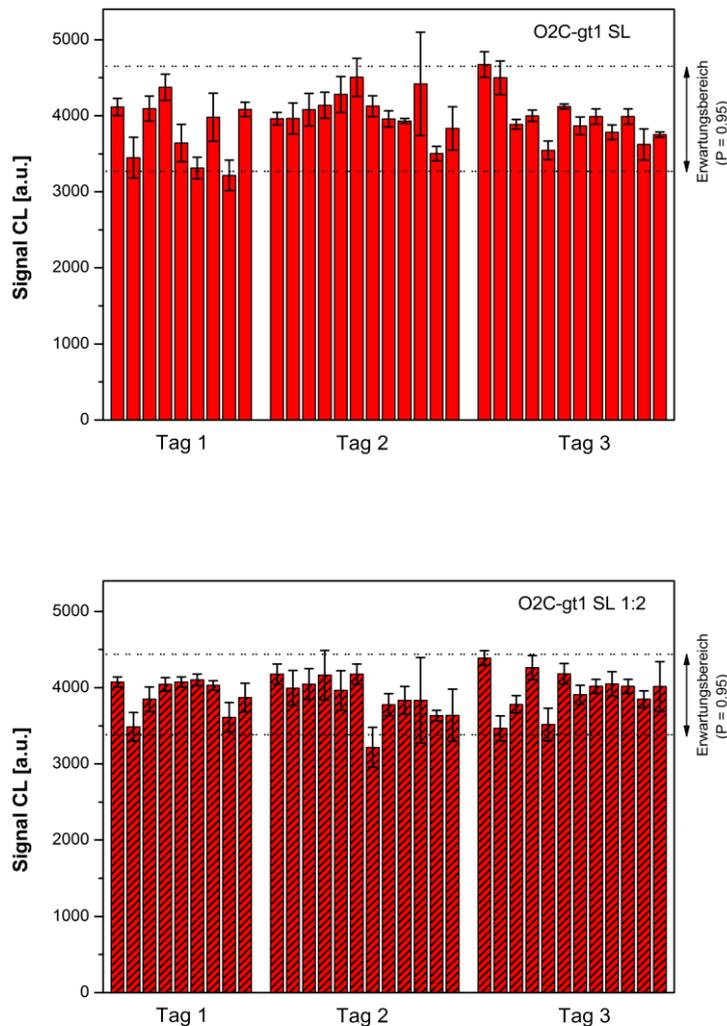


Abbildung 3.21: Ergebnisse der Mehrtagesstudie zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Signale für den Nachweis von anti-HEV IgG auf Basis des Antigens O2C-gt1, gespottet aus der Stammlösung (oben) bzw. ihrer 1:2-Verdünnung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$).

Werden die Ergebnisse für O2C-gt1 in Abhängigkeit der Spottingkonzentration betrachtet, so ist wie in den vorhergehenden Tests festzustellen, dass sich fast identische Absolutsignale ergeben. Über insgesamt 33 Messungen an drei Messtagen hinweg ergeben sich für die Stammlösung des Antigens mittlere Signalintensitäten MW von 3.960 a.u. für die Ausgangskonzentration bzw. 3.910 a.u. für die 1:2-verdünnte Spottinglösung. Wichtiger für die Definition der optimalen Antigen-Konzentration sind somit die auftretenden Signalvarianzen. Hier kann zum einen die Intra-Assay-Varianz eine Aussage über die Qualität und Homogenität der Spots liefern, zum anderen kann aus der Auswertung der Inter-Assay-Varianz in Form des $CV_{\text{Intra-Day}}$ und des $CV_{\text{Inter-Day}}$ eine Aussage über Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit getroffen werden.

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Varianz wurden die relativen Standardabweichungen der jeweils fünf Replikat-Spots der insgesamt 33 gemessenen Flusszellen gemittelt. Mit 4,2 % (Stammlösung) bzw. 4,5 % (1:2-Verdünnung) ergeben sich für beide Spottinglösungen sehr vergleichbare CV-Werte, die für eine hohe Spotqualität sprechen. Aufgrund dieser niedrigen Streuungen lässt sich gleichzeitig schlussfolgern, dass das verwendete Assay-Messprogramm eine gleichmäßige Benetzung der Chipoberfläche mit allen Assay-Reagenzien gewährleistet. Einzig die zehnte Messung am zweiten Messtag weist eine relative hohe Streuung der Spot-Signale für beide Antigen-Reihen im Bereich von ca. 15 % auf, welche auf eine ungleichmäßige Verteilung einer der zugebenen Reagenzienlösungen bei dieser Messung hindeutet.

Die Evaluation von Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der CL-Signale erbringt einen etwas größeren Unterschied für die beiden Konzentrationsstufen von O2C-gt1 als die Auswertung der Intra-Assay-Varianz (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der HEV-Immuno-chips für Antigen O2C-gt1. Die Berechnung basiert auf insgesamt 33 ($n = 33$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die fünf Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | O2C-gt1 SL | | | O2C-gt1 SL 1:2 | | |
|---------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] |
| Tag 1 | 3.808 | 5,1 | 10,8 | 3.905 | 3,2 | 5,7 |
| Tag 2 | 4.059 | 5,0 | 6,6 | 3.872 | 6,2 | 7,2 |
| Tag 3 | 3.978 | 2,8 | 8,3 | 3.955 | 3,8 | 6,9 |
| gesamt | 3.961 | 4,2 | 8,6 | 3.911 | 4,5 | 6,6 |

Die Streuung der CL-Signale für die verdünnte Antigen-Lösung ist mit einem CV_{Inter-Day} von 6,6 % geringer als die der Signale auf Basis der Stammlösung von O2C-gt1 mit 8,6 %. Dabei ist für beide Antigen-Konzentrationen kein wesentlicher Unterschied in den Signal- und Streuungswerten an den einzelnen Messtagen festzustellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass kein Einfluss der Chip- und Spotting-Charge auf die Immobilisierung zu erwarten ist. Gleichzeitig ist auch kein Trend der Signale in Abhängigkeit des verwendeten Flusskanals messbar.

Dieser Unterschied in den Inter-Assay-Varianzen über alle Messungen hinweg geht in die Berechnung des Erwartungsbereiches ein, der sich aus der vorliegenden Standardabweichung der 33 Messwerte und ihrem entsprechenden *Student-t*-Faktor bei $P = 0.95$ ergibt. Es ergibt sich ein Erwartungsbereich von 3.910 ± 530 a.u. für die 1:2-Verdünnung, der somit einen engeren Signalbereich eingrenzt als der korrespondierende Erwartungsbereich von 3.960 ± 690 a.u. für die Messungen mit der höher konzentrierten Stammlösung.

Insgesamt lässt sich die Reproduzierbarkeit des Immuno-chips auf Basis des HEV-Antigens O2C-gt1 aufgrund der Streuung von weniger als 10 % positiv bewerten, wobei die niedrigere Konzentration bessere Ergebnisse liefert.

Das Signalverhalten für O2C-gt3 zeigt dagegen einen deutlich anderen Trend. Hier wirkt sich der notwendige Pufferaustausch wie erwartet negativ auf die Reproduzierbarkeit aus. In Abbildung 3.22 sind die Messwerte für die SDS-haltige Stammlösung bzw. der SDS-freien Spottinglösung dargestellt, die statistischen Parameter sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

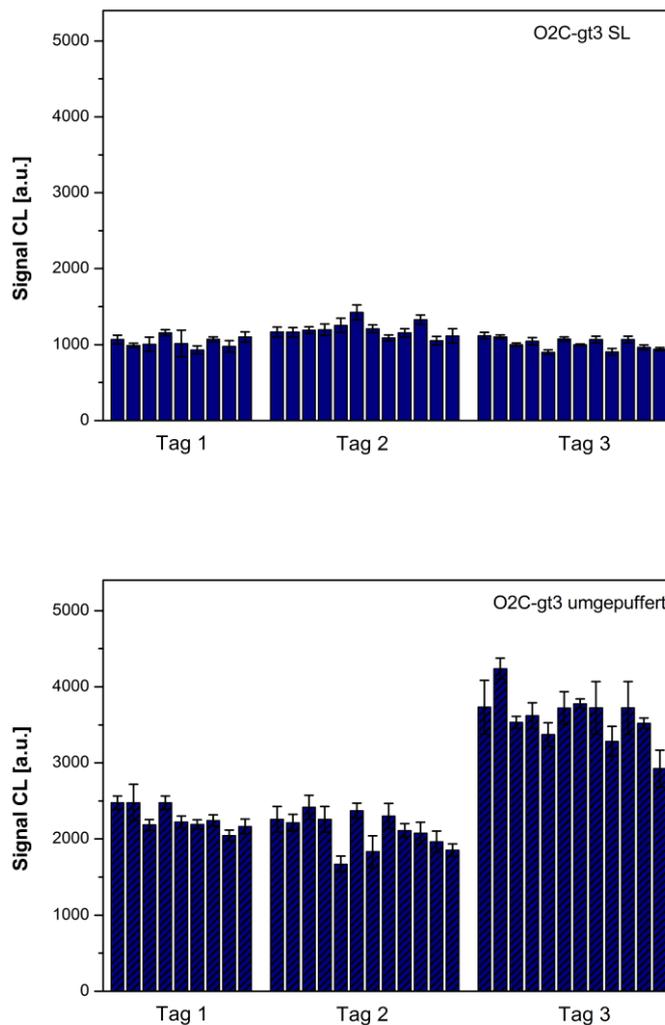


Abbildung 3.22: Ergebnisse der Mehrtagesstudie zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Signale für den Nachweis von anti-HEV IgG auf Basis des Antigens O2C-gt3, gespottet aus der Stammlösung (oben) bzw. nach Pufferaustausch in SDS-freien Spottingpuffer (unten). Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$).

In den Ergebnissen spiegeln sich bei Betrachtung der Absolutsignale die Erkenntnisse der Aktivitätstests für das Antigen O2C-gt3 wider. Die Signale, die sich mit der Stammlösung ergeben, liefern im Hinblick auf die resultierende Wiederholbarkeit zufriedenstellende Ergebnisse, das mittlere Absolutsignal ist jedoch sehr gering und reicht für ein Screening von Seren mit nur geringen Antikörper-Titern nicht aus. Wird der SDS-Gehalt im Spottingpuffer dagegen um den Faktor 10 reduziert, so erhöht sich das erreichbare CL-Signal deutlich, da unter diesen Bedingungen eine höhere Aktivität des Antigens gewährleistet ist. Gleichzeitig war der Vorgang des Pufferwechsels jedoch nicht in gleicher Qualität durchzuführen, so dass

die Reproduzierbarkeit darunter leidet. Daher ist der berechnete Mittelwert über alle Messwerte hinweg von geringer Aussagekraft. Die erhaltenen Intra-Day-Varianzen zeigen jedoch, dass Messungen, welche mit Chips einer Spotting-Charge am selben Tag durchgeführt werden, im Rahmen einer tolerierbaren Schwankung von 7 - 11 % für die Anwendung eines vergleichenden Serenscreenings durchaus geeignet sind.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der HEV-Immuno-chips für Antigen O2C-gt3. Die Berechnung basiert auf insgesamt 33 ($n = 33$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die fünf Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | <i>O2C-gt3 SL</i> | | | <i>O2C-gt3 umgepuffert</i> | | |
|---------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] |
| Tag 1 | 1.035 | 6,7 | 6,7 | 2.276 | 4,2 | 7,1 |
| Tag 2 | 1.196 | 5,5 | 8,5 | 2.111 | 6,5 | 11,2 |
| Tag 3 | 1.106 | 3,2 | 7,4 | 3.597 | 5,5 | 8,9 |
| gesamt | 1.086 | 5,0 | 10,8 | 2.697 | 5,5 | 27,3 |

Für den Nachweis von anti-HEV IgG lässt sich insgesamt zusammenfassen, dass ein reproduzierbarer Durchfluss-Immunoassay auf Basis des Antigens O2C-gt1 etabliert werden konnte, welcher aufgrund der bekannten Kreuzreaktivität für Schweineseren, in denen HEV des Genotyps 3 die Bildung von Antikörpern ausgelöst hat, für ein Serenscreening angewendet werden kann. Das Antigen O2C-gt3 war für eine analytisch präzise Evaluierung von Serumproben weniger gut geeignet, da die Aktivitätsprobleme eine aufwendige und mit Proteinverlusten verbundene Vorbereitung für die Immobilisierung erforderte, die sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse auswirkte. Hier müsste eine eingehende Untersuchung der Antigen-Stabilität durchgeführt werden, um eine Pufferlösung zu finden, in der das Antigen stabil und unter Gewährleistung der Aktivität gelagert werden kann. Die dennoch zufriedenstellende Wiederholbarkeit führte zu der Entscheidung, das O2C-gt3-Antigen für die weiteren Untersuchungen im Mikroarray mitzuführen. Eine praktikable Maßnahme, die mangelnde Reproduzierbarkeit auszugleichen, wäre die Etablierung eines definierten Kontrollserums, auf das alle Messergebnisse eines einzelnen Messtags bezogen werden können.

Messungen mit *Yersinia*-Antigen YopD

Während für die HEV-Analytik bei der Auswahl geeigneter Antigene auf die parallel mittels LIA durchgeführten Messungen zur Seroreaktivität zurückgegriffen werden konnte, konnten die Seren für die Analyse auf Yersinien-Antikörpern nicht mit einer Antigen-spezifischen Methode vergleichend analysiert werden. Nach Einbeziehung der zeitgleich stattfindenden Forschungsarbeiten bei der Fa. Mikrogen wurde aus den zur Verfügung stehenden rekombinanten Antigenen das Antigen YopD für den Nachweis enteropathogener Yersinien als potentiell am besten geeigneten Rezeptor für anti-*Yersinia* IgG für den Immunochip ausgewählt. Das Antigen wurde in einer MOPS-SDS-Stammlösung (20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,01 % SDS) in einer Konzentration von 0,28 mg/mL für die Immobilisierung eingesetzt, nachdem im ELISA die Aktivität des Antigens bei diesem SDS-Gehalt festgestellt werden konnte. Die Verwendung des gleichen Puffersystems, das auch für die Immobilisierung der HEV-Antigene vorlag, garantierte aufgrund des gleichen Benetzungsverhaltens vergleichbare Spotformen. In begleitenden ELISA-Tests konnte zudem gezeigt werden, dass der vorliegende SDS-Gehalt keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des rekombinanten Antigens hat, so dass die Stammlösung des Antigens direkt für das Spotting verwendet werden konnte.

Die Bestimmung der Wiederhol- und Reproduzierbarkeit wurde analog zu den Messungen mit den HEV-Antigenen an drei verschiedenen Messtagen mit jeweils frisch gespotteten Epoxy-PEG-Mikroarrays durchgeführt, wobei allerdings eine insgesamt geringere Zahl an Messungen durchgeführt wurde. Für die Analyse wurde das stark positive Serum Y 2 in 1+100-Verdünnung in PBST verwendet.

In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der Mehrtagesstudie für YopD graphisch dargestellt, die statistische Auswertung ist in Tabelle 3.8 wiedergegeben.

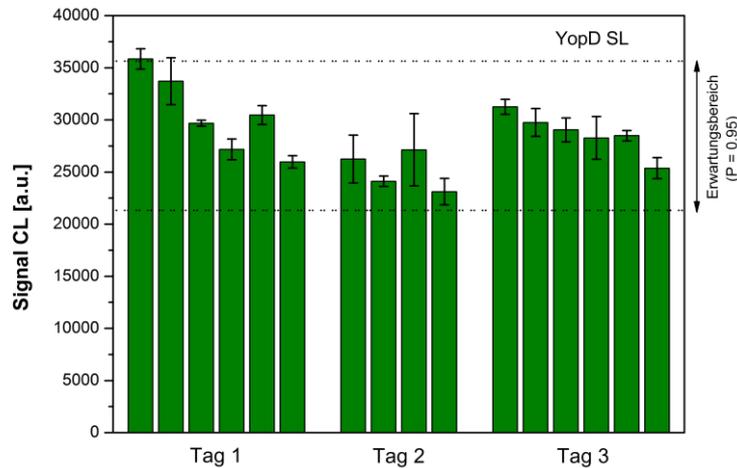


Abbildung 3.23: Ergebnisse der Mehrtagesstudie zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Signale für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG auf Basis des Antigens YopD, gespottet aus der Stammlösung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$).

Mit einem Mittelwert von 28.480 a.u. werden sehr hohe Signalintensitäten erreicht. Der Variationskoeffizient $CV_{\text{Inter-Day}}$ ist unter Berücksichtigung der deutlich geringeren Anzahl an Messungen ($n = 16$) im Vergleich zu der Inter-Day-Studie bei der HEV-Analytik ($n = 33$) mit 11,8 % in einem noch akzeptablen Bereich.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der Yersinien-Immuno-chips für das Antigen YopD. Die Berechnung basiert auf insgesamt 16 ($n = 16$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die fünf Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | YopD SL | | |
|---------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | $CV_{\text{Intra-Assay}}$ [%] | $CV_{\text{Inter-Assay}}$ [%] |
| Tag 1 | 30.477 | 3,2 | 12,4 |
| Tag 2 | 25.153 | 7,3 | 7,4 |
| Tag 3 | 28.696 | 4,0 | 8,8 |
| gesamt | 28.478 | 4,5 | 11,8 |

Die höheren Streuungen für die Messungen mit YopD im Vergleich zu den HEV-Messungen sind auch mit der Verwendung eines Serums mit sehr hohem Antikörper-Titer zu erklären, da das resultierende hohe CL-Signal generell auch mit höheren relativen Fehlern verbunden ist (Heteroskedastizität) (Findlay, 2007). Da für den Yersinien-Nachweis im Unterschied zu den Tests für den HEV-Nachweis kein vorgeschaltetes Antigen-spezifisches Screening mittels LIA möglich war, lagen erst nach dem in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen vergleichenden Serenscreening Informationen über den genauen Antikörpergehalt auf Basis des Antigen YopD vor. Für eine weiterführende Analyse müsste der Test mit einer bezüglich anti-*Yersinia* IgG seropositiven Probe wiederholt werden, welche wie der Großteil der untersuchten Proben in einem mittleren normierten Signalniveau liegt und damit ein ähnliches CL-Absolutsignal liefert wie das für die HEV-Analytik eingesetzte Serum H 12. Die Wiederholbarkeit der mit Serum Y 02 durchgeführten Messungen, ausgedrückt in den in Tabelle 3.8 angegebenen Inter-Assay- bzw. Intra-Day-Varianzen, kann aufgrund der ermittelten CV-Werte im Bereich von 10 % dennoch als grundsätzlich geeignet für die Anwendung des Immuno-chips für ein Serenscreening beurteilt werden.

Fazit

Allgemein zeigen die Mehrtagesstudien aufgrund der ermittelten geringen Inter-Assay-Varianzen für die einzelnen Messtage (Wiederholpräzision) und über die drei Messtage hinweg (Vergleichspräzision), dass der entwickelte Immuno-chip auf Basis des rekombinanten Antigens O2C-gt1 für den Nachweis von anti-HEV IgG sehr gut geeignet ist. Für das Antigen O2C-gt3 konnte eine gute Wiederholbarkeit der Messungen an einzelnen Messtagen festgestellt werden, die Reproduzierbarkeit wird durch den nötigen Puffertausch limitiert. Bei einer zukünftigen Erhöhung der Stückzahl an produzierten Chips sollten sich die technischen Probleme hierbei aufgrund der dann größeren Volumina an Antigenlösung reduzieren lassen. Die Ergebnisse für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG sind ebenfalls positiv zu bewerten, wengleich die Signalschwankungen etwas höher ausfallen.

Gerade bei Berücksichtigung der Assay-Durchführung, die aufgrund der kontinuierlichen Zugabe der Reagenzien ohne Erreichen einer Gleichgewichtseinstellung anfällig für Signalschwankungen ist, erfüllt der Durchfluss-Immuno-chip nicht nur die Anforderung an eine schnelle Analyse, sondern erlaubt auch ein reproduzierbares Arbeiten mit hohem Automatisierungsgrad bei der Assay-Prozessierung und Signalauslesung.

3.3 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen zoonotische Pathogene mittels Immuno-chips am Beispiel von HEV und *Yersinia* spp.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Nachweisverfahren zur Detektion von IgG-Antikörpern, welche infolge einer Infektion von Schlachtschweinen mit pathogenen Erregern gebildet wurden, entwickelt werden. Hierbei lag die Priorität auf Antikörpern gegen zoonotische Pathogene, welche in Serummatrix nachgewiesen werden sollten.

In die Realisierung dieses Vorhabens war zum einen die Fa. Mikrogen einbezogen, zum anderen der Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Fa. Mikrogen war hierbei für die Bereitstellung geeigneter Antigene verantwortlich, der Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit für die Probenahme und Vortestung von Schweineseren. Im Bereich der veterinärmedizinischen Diagnostik ist der Antikörpernachweis als Indikator über Verbreitung und Risikopotenzial von Zoonosen eine bereits seit längerer Zeit anerkannte Methode, allerdings existieren noch nicht für alle relevanten Erreger kommerziell erhältliche Testsysteme. Diese Tatsache legt die Grundlage für das Potenzial des zu etablierenden Multiplex-Immuno-chips, jedoch ist damit auch das Problem verbunden, dass es für die Entwicklung einer neuen Methode an Referenzmöglichkeiten mangelt. Hier spielt eine große Rolle, dass für die Seroprävalenz-Untersuchungen in der Tiermedizin kaum aufgereinigte Antikörper verfügbar sind, die für Spezifitäts- und Sensitivitäts-Studien verwendet werden können. Die Austestung der Rezeptoren erfolgt daher in der Regel mit realen Seren und neue Assays werden - soweit möglich - mit bestehenden Testsystemen hinsichtlich der Übereinstimmung von Befunden evaluiert, wobei unbekannte Kreuzreaktivitäten immer mit berücksichtigt werden müssen (Wenzel, 2013).

Um eine neue Methode zu entwickeln, ist es somit eine Grundvoraussetzung, auf Seren für die Austestung zurückgreifen zu können, die bereits mit anderen Testmethoden hinsichtlich der enthaltenen Antikörper vorgetestet wurden. Eine alternative Methode, um an Seren mit den gewünschten Zielantikörpern zu gelangen, ist die definierte Infektion von Versuchstieren mit dem Erreger. Eine solche künstliche Inokulation ist jedoch ein aus Tierschutzgründen genehmigungspflichtiges Verfahren.

Für die Entwicklung des Immuno-chips wurden daher Zielantikörper ausgewählt, für welche auf Referenz-Immunoassays zurückgegriffen werden konnte, um die erzielten Ergebnisse zu vergleichen. Aufgrund der Expertise der Fa. Mikrogen im Bereich der humandiagnostischen

Infektionsserologie stand eine größere Zahl an nativen und rekombinanten Antigenen für verschiedene Pathogene zur Verfügung, auf denen bereits kommerzielle Immunotests wie ELISAs, Line Immunoassays (LIAs) und auch Bead-Assays basieren. Für den Nachweis von HEV-Antikörpern lagen im Rahmen der Kooperation mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU darüber hinaus Schweineseren für die Adaption des humanen ELISA-Kits *recomWell HEV IgG/IgM* für die Veterinärmedizin vor, welches mittlerweile unter dem Handelsnamen PrioCheck® HEV porcine von Prionics vertrieben wird. Dieses Kit basiert auf einer Beschichtung der Mikrotiterplatte mit einem Gemisch von verschiedenen HEV-Antigenen. Für das an der LMU durchgeführte Vorscreening konnte dieser Test verwendet werden, für die Referenzierung des Immunochips eignete er sich jedoch nicht, da hier eine Antigen-spezifische Signalauslesung etabliert werden sollte. Um eine Aussage über die Seroreaktivität einzelner Antigene zu erhalten, wurde der von der Fa. Mikrogen für die Humandiagnostik etablierte *recomLine HEV IgG/IgM* verwendet. Dieser *Line Immunoassay* (LIA) basiert auf einem Nitrocellulose-Streifen, auf dem verschiedene Antigene als diskrete Banden immobilisiert sind (siehe Kapitel 2.2.2). Dieser Teststreifen konnte für die Analyse von Schweineseren durch Einsatz des entsprechenden porcinen Detektionsantikörpers adaptiert werden.

Im Verlauf der Arbeit wurden Serumproben genommen, die auf Antikörper gegen pathogene Yersinien untersucht werden sollten. Hier diente das kommerziell erhältliche ELISA-Kit *pigtype Yersinia Ab (1)* von Qiagen als Vergleichsmethode.

Um einen zusätzlichen Vergleichspunkt zu haben, wurde darüber hinaus auf Grundlage der unter Kapitel 3.1.2 beschriebenen ELISA-Experimente eigene ELISA-Tests für den Nachweis von anti-HEV bzw. anti-*Yersinia* IgG auf Basis einzelner Antigene entwickelt, um für beide Erreger je drei immunologische Nachweismethoden hinsichtlich ihrer jeweiligen Sensitivität vergleichen und damit den neu entwickelten Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay (CL-MIA) charakterisieren zu können.

Die zur Verfügung stehenden Seren sind in Anhang B angegeben. Die Proben wurden im Zeitraum 2009 bis 2012 von der LMU vorwiegend an bayerischen Schlachthöfen gesammelt, zu Seren verarbeitet und bis zur Testung aliquotiert eingefroren. Die Seren, die auf HEV-Antikörper vorgetestet worden waren, sind mit einem vorgestellten „H“ gekennzeichnet, die auf Yersinien-Antikörper voruntersuchten Serumproben mit einem „Y“.

3.3.1 Etablierung eines Cut-Off-Wertes für die Positiv/Negativ-Diskriminierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit der etablierten Oberflächenchemie und einem optimierten Messprogramm stabile Messsignale mit seropositiven Proben für einen Nachweis von anti-HEV und anti-*Yersinia* IgG-Antikörpern erzielt werden können, bestand der nächste Schritt der Prinzipstudie darin, ein Entscheidungskriterium für eine qualitative Screening-Methode auf Basis des Immunochips einzuführen. Aufgrund der bereits erwähnten Tatsache, dass es im Bereich der Veterinärmedizin kaum möglich ist, an aufgereinigte und charakterisierte Antikörper zu gelangen, schieden definierte *Spiking*-Experimente für die Assay-Charakterisierung aus. Stattdessen wurde mit realen Seren gearbeitet und basierend auf der Leerwert-Methode eine Möglichkeit zur Etablierung eines *Cut-Off*-Wertes erarbeitet und ihre Eignung in späteren Verdünnungs- und Screening-Experimenten erprobt.

3.3.1.1 Der Cut-Off-Wert als Entscheidungskriterium in der immunoanalytischen Diagnostik

In der medizinischen Diagnostik hängen von der Richtigkeit eines Befundes sehr oft die Therapie der indizierten Krankheit und damit verbunden auch die Gesundheit des Patienten ab. Daher muss ein neues diagnostisches Verfahren eine Validierungsphase durchlaufen, bevor es in der Routineanalytik etabliert werden kann.

Von wesentlicher Bedeutung sind hierbei das Kriterium für die Diskriminierung von negativen und positiven Befunden und der Umgang mit Proben, die in einem Graubereich liegen. Gerade in der Medizin spielt es eine große Rolle, wie anfällig eine Methode für falsch-positive bzw. falsch-negative Befunde ist, da hier entweder gesunde Patienten fälschlicherweise als krank eingestuft werden (α -Fehler) oder eigentlich kranke Patienten aufgrund eines falschen negativen Befundes (β -Fehler) nicht therapiert werden.

Daher werden in der Humanmedizin neben dem Nachweis von serologischen Auffälligkeiten in Form von erhöhter Produktion von Antikörpern, Toxinen, Metaboliten oder anderen Markern die korrespondierenden klinischen Symptome abgefragt, um einen Befund auf Basis beider Kriterien abzusichern. In der Infektionsserologie wird häufig neben einem direkten oder indirekten immunologischen Nachweis als zweite Methode eine Probenanalyse mittels PCR durchgeführt.

Für die Etablierung einer neuen Methode bedeutet dies in der Regel, dass der neue Test im Rahmen einer klinischen Studie mit gesunden und definitiv kranken Testpersonen erprobt und

anhand der Testergebnisse die Präzision der neuen Methode bestimmt wird. Das Zurückgreifen auf ein größeres Panel an Probenmaterial von klinisch gesunden und kranken Personen bietet zwei Vorteile für die Charakterisierung einer neuen Methode.

Zum einen liegt aufgrund der Vielzahl an gesunden und kranken Patienten eine große Matrixvielfalt vor, welche die realen Bedingungen widerspiegelt, so dass die Proben sowohl der Kranken als auch der Gesunden eine bestimmte Signalvarianz der beiden Cluster zeigen werden. Hieraus kann dann ein Signalniveau, der sogenannte *Cut-Off*-Wert, definiert werden, das gesunde von kranken Proben diskriminiert und gleichzeitig auch natürliche Konzentrationsschwankungen für den Zielanalyten in gesunder Matrix berücksichtigt. Abhängig von dem gesuchten Analyten kann gerade bei biologischem Probenmaterial wie Urin, Speichel oder Serum das Hintergrundsignal von eigentlich gesunden Patienten hinsichtlich des gesuchten Analyten deutlich variieren.

Zum anderen kann über ein definiertes Seren-Panel die neu etablierte Methode auf die Fehlerwahrscheinlichkeit getestet werden. Hierzu werden alle Proben untersucht und dann die Spezifität und Sensitivität des Nachweises ermittelt. In der medizinischen Diagnostik beschreibt dabei die Sensitivität des Assays den Anteil an Test-positiven Personen unter den Kranken, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass der Test die kranken Personen tatsächlich erkennt. Eine Sensitivität von 100 % bedeutet dementsprechend, dass keine falsch-negativen Befunde vorliegen und damit kein β -Fehler auftritt. Die Spezifität dagegen befasst sich mit den gesunden Patienten und erfasst den Anteil an Test-negativen Proben unter ihnen. Im Idealfall liegen keine falsch-positiven Befunde vor, d.h. der Assay ist zu 100 % spezifisch, da er nur mit Proben von Kranken reagiert.

Um einen hochspezifischen und hochsensitiven diagnostischen Test zu entwickeln, ist es daher von großer Bedeutung, den *Cut-Off*-Wert richtig zu legen. Liegt dabei ein großes Spektrum an definierten Proben vor, kann durch Anpassung des *Cut-Off*-Niveaus die Auswirkung auf die Präzision des Befundes überprüft und eine optimal eingestellte *Cut-Off*-Kontrolle eingeführt werden.

Da es nicht immer möglich ist, beide Kriterien zu 100 % zu erfüllen, hängt es auch vom jeweiligen Analyten und Anwendungszweck ab, ob es wichtiger ist, eine Erkrankung bzw. serologische Auffälligkeit sicher ausschließen zu können oder diese mit Sicherheit bestätigen zu können, d.h. umgekehrt, welcher Irrtum leichter in Kauf genommen kann. Die Beurteilung der vorliegenden Assay-Eigenschaften wird in der Diagnostik häufig anhand sogenannter ROC (*receiver operating characteristic*)-Kurven vorgenommen, bei denen Sensitivität und

Spezifität gegeneinander aufgetragen und aus dem Kurvenverlauf auf die Aussagekraft des Tests geschlossen werden kann (Dremsek, 2012).

Der LIA-Test *recomLine* HEV IgG/IgM der Fa. Mikrogen wurde für die Humandiagnostik validiert und erreichte bei der Probenuntersuchung und RT-PCR als klinische Absicherung der tatsächlichen Erreger-Existenz eine Sensitivität von 100 % ($n = 16$), die Spezifität der Methode bezogen auf 168 negative Befunde, welche mit zwei ELISA-Tests ermittelt worden waren, betrug für anti-HEV IgG 98,8 %, d.h. zwei der zuvor negativ getesteten Proben lagen über dem Cut-Off-Index (COI) der LIA-Methode.

An diesem Beispiel lässt sich eine zweite gebräuchliche Praxis zur Methodvalidierung erkennen, die gerade in der Antikörper-Diagnostik häufig angewendet wird. Da die Anwesenheit von Antikörpern aufgrund des je nach Krankheitstyp unterschiedlich verlaufenden Inkubationszeitraums bis zur Antikörperproduktion nicht immer mit akuten klinischen Symptomen korreliert werden können bzw. der auslösende Erreger evtl. nicht mehr nachgewiesen werden kann, wird eine neuer Test häufig nicht mit einer direkten Nachweismethode oder klinischen Symptomen referenziert. Stattdessen werden die ermittelten Seroprävalenzraten mit anderen, bereits etablierten Tests zum Antikörpernachweis abgeglichen. Weichen die Befunde von vergleichend durchgeführten Probenscreenings zu sehr voneinander ab, so ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass einer der beiden Assays entweder ein anderes analytisches Nachweisvermögen besitzt, eines der Cut-Off-Niveaus falsch eingestellt ist, oder aber die Assays auf Matrixeffekte oder Kreuzreaktivitäten unterschiedlich reagieren (Wenzel, 2013).

Während in der Humanmedizin die Methodvalidierung anhand von Patientenstudien und Abklärung von klinischen Symptomen im Regelfall definiert möglich ist, gestaltet sich die Etablierung von neuen diagnostischen Verfahren in der Veterinärmedizin komplizierter. Hier können selten mit dem gleichen Aufwand Studien mit kranken und gesunden Individuen betrieben werden. Im Spezialfall der zoonotischen Infektionen kommt darüber hinaus erschwerend hinzu, dass es aufgrund des häufig asymptomatischen Verlaufs der Infektion nicht möglich ist, den Antikörpernachweis anhand bestimmter Krankheitsanzeichen abzusichern. Hier bietet sich nur die erwähnte Option, den immunologischen Befund über die PCR-Diagnostik zu bestätigen, was voraussetzt, dass Erreger und Antikörper zum gleichen Zeitpunkt im Tier nachweisbar sind. Da auch dies mit einem hohen Kostenaufwand verbunden ist, werden neue Immunoassay-Testformate in der Regel anhand des Vergleichs mit bereits kommerziell erhältlichen Tests charakterisiert. So beziehen sich z.B. die Werte für

Sensitivität und Spezifität des in dieser Arbeit für das Vorscreening der Seren eingesetzten kommerziellen ELISA-Kits PrioCheck® HEV porcine (Prionics) auf die Ergebnisse des für Schweineseren adaptierten LIA *recom*Line HEV IgG/IgM (Mikrogen).

Bevor ein solcher Vergleich durchgeführt werden kann, muss dennoch für die neue Nachweismethode zuerst ein Cut-Off-Wert definiert werden. Für die Validierung von qualitativen Screening-Verfahren in der Rückstandsanalytik existieren auf EU-Ebene Definitionen, welche Hilfestellungen für die veterinärmedizinische Diagnostik in Bezug auf die Entscheidung der EU-Kommission nach 2002/657/EG zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG leisten (Guideline, 2010). Diese Leitlinie enthält auch Anweisungen zur Etablierung eines Cut-Off-Niveaus für Immunoassays. Hierbei beziehen sich die Leitlinien auf die Messungen von Leerwert-Proben und Proben, die mit einer bestimmten Analyt-Konzentration versetzt werden, welche mit dem Verfahren mindestens nachgewiesen werden soll. Existiert ein festgesetzter Grenzwert (MRL), so sollte die Zielkonzentration geringer sein als der Grenzwert, idealerweise dessen halbe Konzentration. Für die Leerwert-Proben (Blindproben, *blanks*) sollten nicht kontaminierte Proben aus verschiedenen Chargen der gleichen Matrix verwendet werden, d.h. übertragen auf die Tiermedizin, von verschiedenen gesunden Individuen und je nach Anwendungszweck verschiedenen Spezies. Für die Cut-Off-Definition sollten mindestens 20 Blindproben und 20 aufgestockte Proben pro Konzentrationsstufe analysiert werden, für die Auswertung der Messungen werden zwei Varianten vorgeschlagen.

Eine Methode basiert darauf, zu untersuchen, bei welcher Analyt-Konzentration sich das niedrigste Messsignal mit dem höchsten erhaltenen Messsignal für die Blindprobe überlappt. Dabei darf ein β -Fehler von 5 % toleriert werden. Wird diese Toleranz eingehalten, so entspricht das Cut-Off-Niveau dann dem überlappenden Signal der Blindprobe und die entsprechende Probenkonzentration wird als das Nachweisvermögen ($CC\beta$) der Methode definiert.

Bei der zweiten Variante dient als Basis für den Cut-Off-Wert nicht ein einzelner Signalwert, sondern es wird die Standardabweichung der Probenmessungen als statistischer Bezugspunkt herangezogen. Dabei erlaubt ein β -Fehler von 5 % mit einer Varianz der Messwerte von 1,64 Standardabweichungen bei gleichzeitig geringem α -Fehler eine Abgrenzung zwischen Blindproben und aufgestockten Proben (siehe Abbildung 3.24). Wird nun auf den Mittelwert der Blindprobenmessung die 1,64-fache bzw. eine höhere Standardabweichung (je nach tolerierbarem α -Fehler) addiert, so ergibt sich daraus ein Signal-Schwellenwert, der als

korrespondierende Konzentration $CC\alpha$ ausgegeben werden kann. Dem Mittelwert der Messungen mit den aufgestockten Proben wird dagegen das 1,64-fache (für $\beta = 0,05$) der Standardabweichung abgezogen, um einen Cut-Off-Wert bzw. die Konzentration für $CC\beta$ zu bestimmen. Für einen validierten $CC\beta$ -Wert muss konsequenterweise der Cut-Off-Wert oberhalb des Schwellenwerts der Blindproben liegen.

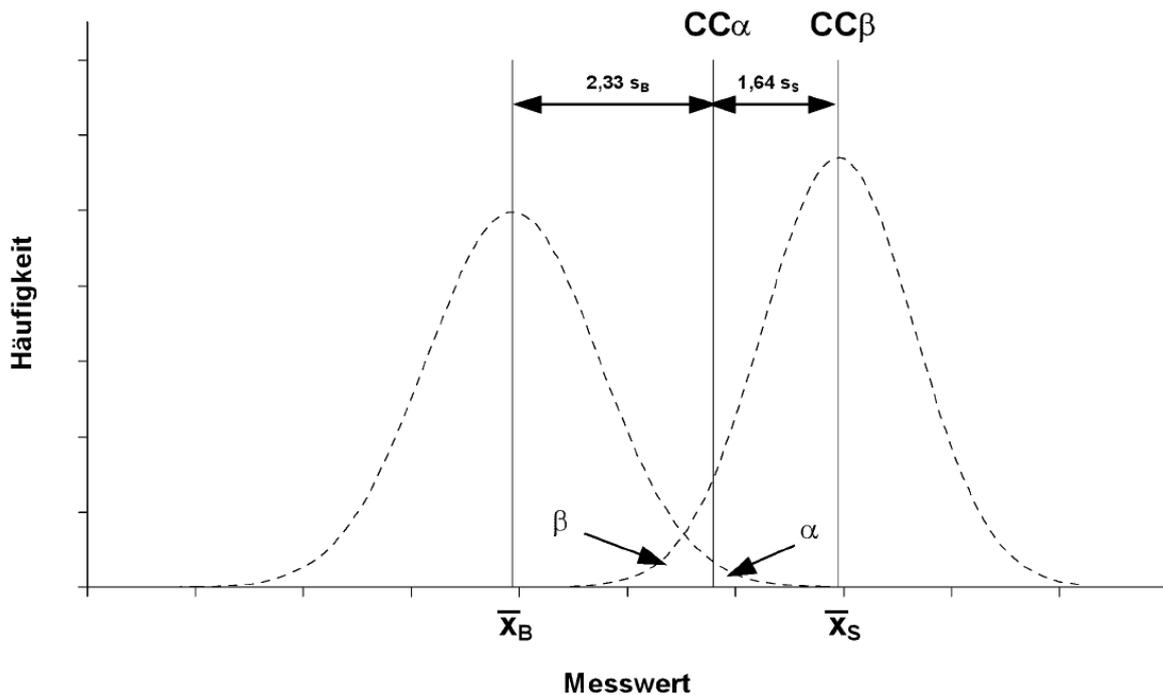


Abbildung 3.24: Graphische Darstellung von analytischen Grenzdefinitionen mit

\bar{x}_B / s_B = Mittelwert / Standardabweichung der Blindproben, \bar{x}_S / s_S = Mittelwert / Standardabweichung der aufgestockten Proben, α = falsch-positive Rate, β = falsch-negative Rate, $CC\alpha$ = Entscheidungsgrenze für definierten α -Fehler, $CC\beta$ = Nachweisvermögen (für $\beta = 0,05$). Abbildung entnommen aus (Guideline, 2010).

Bei beiden Varianten werden also Spiking-Experimente als Entscheidungskriterium herangezogen. Da dies für die Serumantikörper als Zielanalyten nicht möglich war, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Cut-Off-Wert nur auf Basis von Leerwert-Messungen eingeführt werden. Hierbei musste zudem berücksichtigt werden, dass auch das Kriterium, verschiedene Blindproben zu analysieren, nicht erfüllt werden konnte, da - wie das Vorscreening ergeben hatte - aufgrund der hohen Seroprävalenz für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Antikörper kaum definitiv negative Serumproben zur Verfügung standen. Daher wurde für eine erste Prinzipstudie nur eine Blindprobe analysiert, diese jedoch in Form von

Mehrfachmessungen über mehrere Messtage hinweg. Damit wird folglich die evtl. auftretende natürliche Signalvarianz aufgrund von Matrixeffekten und Kreuzreaktivitäten nicht berücksichtigt, sondern vielmehr die Stabilität der Messmethode analog zu den Reproduzierbarkeitsmessungen mit positiven Proben ermittelt. Kann die Reproduzierbarkeit anhand geringer Variationskoeffizienten als gegeben angesehen werden, ist dann die Berechnung eines Cut-Off-Niveaus auf Basis der Standardabweichung eine für eine Prinzipstudie sinnvolle Verfahrensweise. Ein Bezug auf einzelne Signalwerte, wie er in der oben beschriebenen ersten Variante zur Cut-Off-Ermittlung angewendet wird, ist aufgrund der Abwesenheit von Signalausreißern nicht erforderlich. Darüber hinaus bietet die Bestimmung eines Cut-Off-Wertes anhand der Reproduzierpräzision den Vorteil, dass daraus ein für die Methode allgemeingültiger Schwellenwert eingeführt werden kann, der es nicht erfordert, an jedem Messtag Kontrollproben für die Evaluation der Realproben mitzutesten. Bei kommerziellen ELISAs ist die vergleichende Analyse von Negativ-, Positiv- und Cut-Off-Kontrollen dagegen Voraussetzung, da das Absolutsignal der Assays aufgrund vielfältiger äußerer Einflussfaktoren nicht reproduzierbar ist.

Die Ermittlung eines Cut-Off-Wertes über die Blindproben kann im Unterschied zu der üblichen Berechnung mittels aufgestocker Proben nicht den β -Fehler berücksichtigen, sondern bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Befunde. Je geringer die Toleranz für den α -Fehler festgelegt wird, desto größer wird der für einen positiven Befund nötige Signal-Schwellenwert. Auf dieser Grundlage basiert auch die gebräuchliche Ermittlung der Nachweisgrenze über die Leerwertmethode nach DIN 32645 für quantitative Verfahren. Hier wird von einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 50 % ausgegangen, d.h. bei der Mehrfachmessung einer Probe wird der Schwellenwert zur Hälfte der Messungen unter- bzw. überschritten. Die Nachweisgrenze wird in der Regel über die Addition der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert der Blindprobenmessungen abgeschätzt. Dies gewährleistet ein für die analytische Beurteilung von Proben hinreichendes SNR. Um die Sicherheit des Nachweises zu erhöhen bzw. die Irrtumswahrscheinlichkeit zu mindern, wurden weitere Entscheidungskriterien wie die Erfassungsgrenze (95 % Nachweiswahrscheinlichkeit) und die Bestimmungsgrenze eingeführt, bei welchen für die Abschätzung noch höhere Faktoren der Streuung in die Berechnung eingehen. Erst bei Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze, häufig mit der neunfachen Standardabweichung berechnet, werden quantitative Analysenergebnisse ausgegeben.

Übertragen auf die qualitative Analytik bedeutet die Einbeziehung einer höheren Standardabweichung in die Ermittlung des Cut-Off-Wertes, dass die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse geringer wird, d.h. der α -Fehler sinkt. Für die Bestimmung des Cut-Off-Grenze der Immunochip-Methode wurde die Priorität auf die Vermeidung falsch-positiver Befunde gelegt, da im Gegensatz zu toxischen oder krebserregenden Kontaminanten eine Zunahme von falsch-negativen Befunden hinsichtlich der Existenz von Antikörpern gegen Pathogene leichter in Kauf genommen werden kann. Gleichzeitig wurde durch eine bewusst höher gelegte Toleranzschwelle berücksichtigt, dass in die resultierende Standardabweichung nur das Serum eines einzelnen Individuums eingeht.

Der Antikörper-Gesamtgehalt verschiedener Serumproben kann sich beispielsweise in Abhängigkeit des Alters und des Gesundheitszustandes der Individuen deutlich unterscheiden. Durch unspezifische bzw. kreuzreaktive Anbindung von Antikörpern an die immobilisierten Antigene würde das Leerwertsignal daher von Probe zu Probe deutlich divergieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Streuung bei der Mehrfachmessung einer einzigen Negativprobe geringer ausfällt als bei der Bestimmung vieler Negativproben. Um diesen Sachverhalt zu berücksichtigen, wurde der Cut-Off-Wert CO nach Gleichung 3.1 als Summe aus dem Mittelwert MW_B der Blindprobenmessungen zuzüglich der zehnfachen Standardabweichung s_B definiert.

$$CO = MW_B + 10 \cdot s_B \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Als Blindproben wurden Serumproben ausgewählt, welche in den Referenz-Immunoassays die geringsten Signale für anti-HEV IgG bzw. anti-*Yersinia* IgG aufwiesen. Die Serumprobe H 27 zeigte dabei im LIA-Test bezogen auf die dort implementierte Cut-Off-Bande kein Signal für HEV-Antikörper an ($COI = 0.0$), das Serum Y 21 ergab im kommerziellen ELISA-Test *pigtype* Yersinia Ab (Qiagen) ebenfalls kein Signal für Yersinien-Antikörper.

3.3.1.2 Leerwert-Messungen zur Berechnung von Cut-Off-Werten für anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG

Die Leerwertmessungen wurden in Analogie zu den Messungen für die Beurteilung der Signalstabilitäten durchgeführt. Es wurden Antigen-Mikroarrays mit den beiden rekombinanten HEV-Antigenen O2C-gt1 und O2C-gt3 und dem rekombinant hergestellten *Yersinia outer protein* YopD hergestellt und die Signalstabilitäten hinsichtlich der Wiederholpräzision ($CV_{\text{Intra-Day}}$) und der Reproduzierbarkeit, d.h. der Vergleichspräzision ($CV_{\text{Inter-Day}}$) der Messungen, beurteilt. Die Messungen erfolgten an jeweils drei Messtagen unter Verwendung verschiedener Spotting-Chargen und frischer Herstellung bzw. Verdünnung der Detektionsantikörperlösung und der Seren H 27 und Y 21. Auf Basis dieser Messergebnisse wurden das jeweilige Cut-Off-Niveau nach Gleichung 3.1 berechnet.

Messungen mit HEV-Antigenen

Für die Messungen zur Bestimmung eines Cut-Off-Wertes für die HEV-Analytik wurden die Messungen mit Serum H 27 sowohl für die Signale für das Antigen O2C-gt1 als auch für O2C-gt3 ausgewertet. Für ORF2C-gt1 wurden wie in Kapitel 3.2.3 die Signale der Stammlösung sowie der 1:2-Verdünnung der Stammlösung ausgewertet.

Insgesamt wurden 26 Messungen an drei Tagen durchgeführt. Dabei wurde an einem Messtag ausschließlich das Serum H 27 gemessen, an den anderen beiden Tagen wurde die Blindprobe wiederholt in die Messung von anderen Realproben eingeschoben, so dass die Signalwerte auch eine Aussage über evtl. vorhandene Verschleppungen im Durchflusssystem liefern können.

Die Absolutsignale der Leerwertmessungen sind für O2C-gt1 in Abbildung 3.25 graphisch dargestellt, die Ergebnisse für O2C-gt3 in Abbildung 3.26. In den Graphen sind sowohl die Grenzen des Erwartungsbereiches für $P = 0,95$ als auch die nach Gleichung 3.1 berechneten Cut-Off-Werte eingetragen.

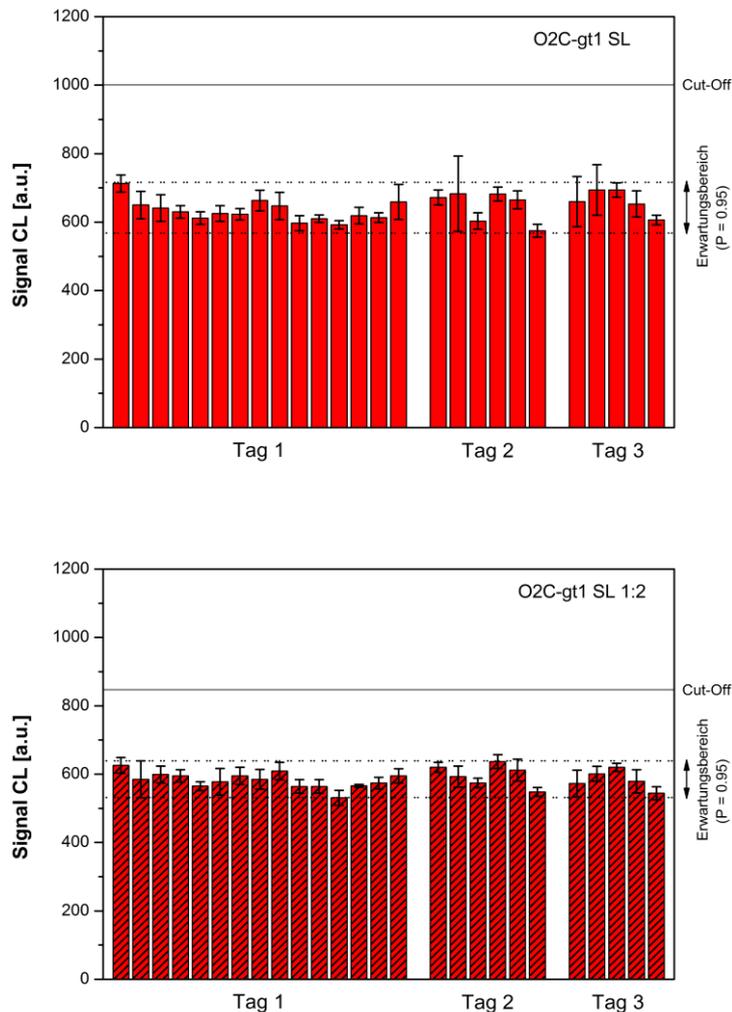


Abbildung 3.25: Darstellung der Mehrtagesstudie zur Etablierung eines Cut-Off-Niveaus für den Nachweis von anti-HEV IgG in Schweineserum auf Basis von Antigen O2C-gt1, gespottet mit der Stammlösung (oben) bzw. mit deren 1:2-Verdünnung (unten). Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz ($m = 5$).

Für beide Antigene werden CL-Signale im Bereich zwischen 500 – 700 a.u. erreicht. Vergleicht man diese Signalwerte mit dem Hintergrundsignal auf der nicht mit Antigen belegten Chipoberfläche, so zeigt sich, dass die Spotflächen ein erhöhtes Signal aufweisen, welches auf den Bildern der CCD-Kamera die Spots optisch sichtbar macht (siehe Abbildung 3.30). Da die Chipoberfläche einheitlich mit Tris und BSA geblockt wurde, kann diese Tatsache entweder durch eine leichte Kreuzreaktivität des Antigens mit anderen Serumantikörpern begründet werden oder das anhand der Messung mittels LIA als Blindprobe ausgewählte Serum enthält geringe Mengen an anti-HEV IgG, welche der ImmunoChip im Gegensatz zum LIA nachweisen kann. Diese Vermutung kann dadurch

gestützt werden, dass auf den LIA-Teststreifen, die mit Serum H 27 inkubiert wurden, weder im Bereich der Antigen-Banden noch auf dem Rest des Streifens eine leichte Färbung zu erkennen war, die auf unspezifische oder kreuzreaktive Bindungen hinweisen würde. Für eine genauere Beurteilung, ob das Serum tatsächlich Antikörper gegen HEV enthält, fehlt es an Referenzmethoden, die exakt diesen Antikörper zweifelsfrei im Serum nachweisen können. Die einzige Möglichkeit, einen spezifischen Antikörper aus der Matrix identifizieren zu können, wäre ein Immunoblot. Hierzu wäre jedoch ein selektiver Rezeptor als Fänger Voraussetzung, den in diesem Fall wiederum ein immobilisiertes Antigen darstellen würde. Die häufig verwendete Methode, Antikörper mittels Protein A/G-Säulen oder -Beads aufzureinigen, ist für die Charakterisierung eines einzelnen Antikörpers in Realseren ebenfalls keine Option, da hier aufgrund der Bindung des F_c-Teils keine Selektion der Antikörper nach ihren Paratopen stattfindet, so dass die Antikörper-Fraktion ein Gemisch verschiedener IgG-Antikörper sowie in kleinerem Anteil auch IgM, IgA und IgD-Antikörper enthalten würde. Gleichzeitig würde eine solche Immunofiltration des Serums mit dem Fusionsprotein A/G jedoch den größten Teil aller Antikörper aus der Probe abtrennen, so dass eine Matrix vorliegen würde, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keine Zielantikörper mehr enthalten und damit in Hinsicht auf den Analyten eine geeignete Matrix für Leerwert-Messungen darstellen würde.

Der Nachteil bei einer solchen Verfahrensweise zur Herstellung einer Blindprobe liegt allerdings darin, dass in diesem Fall nicht nur der Analyt aus der Probe entfernt wird, sondern auch alle anderen Antikörper, die hinsichtlich von Kreuzreakтивitäten, Inhibitionen und Adsorptionseffekten zur Abbildung der realen Matrix notwendig sind. Darüber hinaus wird für die Aufreinigung mittels Protein A/G ein Puffer eingesetzt, der zusätzlich die ursprüngliche Serummatrix verdünnt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet, eine solche Probe als Blindprobe für die Berechnung eines Cut-Off-Niveaus einzusetzen. Für die Untersuchung von Matrixeinflüssen auf das Ansprechverhalten des Immuno-chips wurde das aufgereinigte Serum jedoch getestet.

Der Vergleich der Ergebnisse der Messungen mit den beiden Spottinglösungen für O2C-gt1 erbringt etwas geringere Absolutsignale und geringere Inter-Assay-Varianzen für die geringere Konzentrationsstufe (siehe Tabelle 3.8). Für die Stammlösung ergibt sich ein Signal von 640 ± 40 a.u. für die Blindprobenmessungen und für die 1:2-Verdünnung ein CL-Signal von 590 ± 30 a.u.. Damit liegen für beide Antigenlösungen die Varianzen über alle Messtage

hinweg im Bereich von lediglich 5 %. Diese geringe Streuung unterstreicht die hohe Wiederhol- und Vergleichspräzision des Immuno-chips, wie sie bereits für die Mehrtagesstudie mit seropositiven Proben gezeigt werden konnte.

Aufgrund der für die verdünnte Antigenlösung etwas geringeren Signalstreuung resultiert hier folglich ein engerer Erwartungsbereich, der zukünftige Blindprobenmessungen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % in einem Signalbereich von 590 ± 50 a.u. indiziert, was einer Streuung von weniger als 10 % entspricht.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der HEV-Immuno-chips für Antigen O2C-gt1. Die Berechnung basiert auf insgesamt 26 ($n = 26$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die fünf Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | O2C-gt1 SL | | | O2C-gt1 SL 1:2 | | |
|---------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] |
| Tag 1 | 633 | 4,0 | 4,9 | 582 | 4,1 | 3,9 |
| Tag 2 | 647 | 5,6 | 7,1 | 597 | 3,5 | 5,5 |
| Tag 3 | 661 | 6,6 | 5,5 | 583 | 4,4 | 4,9 |
| gesamt | 642 | 4,9 | 5,6 | 586 | 4,0 | 4,5 |

Das für die geringere Antigen-Konzentration niedrigere Absolutsignal und der ebenfalls niedrigere CV-Wert führen zu einem Unterschied in den berechneten Cut-Off-Werten der beiden Antigen-Lösungen. Während sich der Schwellenwert für die Stammlösung von O2C-gt1 bei Addition der zehnfachen Standardabweichung zum Mittelwert auf 1.000 a.u. berechnet, ergibt sich für Spots der 1:2-Verdünnung eine Cut-Off-Grenze von 850 a.u.. Berücksichtigt man die Signaltrends, die in Kapitel 3.2.3.3 mit dem seropositiven Serum H 12 ermittelt wurden, lässt sich aus dem dort sehr vergleichbaren Signalmittelwert ein evtl. etwas besseres Nachweisvermögen mit der niedriger konzentrierten Antigenlösung ablesen. Allerdings ist diese Aussage statistisch nicht belastbar, solange sie nur auf Basis von zwei verschiedenen Realseren getroffen werden kann.

Für die Blindprobenmessungen auf Basis des Antigens O2C-gt3 werden grundsätzlich ähnliche Absolutsignale erreicht (siehe Abbildung 3.26). Der Mittelwert der Mehrtagesstudie

ergibt sich zu 610 ± 40 a.u., wobei die korrespondierende Inter-Assay-Varianz 7,8 % beträgt (siehe Tabelle 3.9).

Diese zufriedenstellende Signalstabilität unterscheidet sich somit deutlich von dem resultierenden $CV_{\text{Inter-Assay}}$ der Messungen mit Serum H 12, bei denen sich die vor jedem Messtag erforderliche Umpufferung des rekombinanten Antigens sehr negativ auswirkt. Für die geringeren Signalschwankungen bietet die Heteroskedasizität der CL-Signale eine plausible Erklärung, wenn eine Spezifität der Spot-Signale angenommen wird.

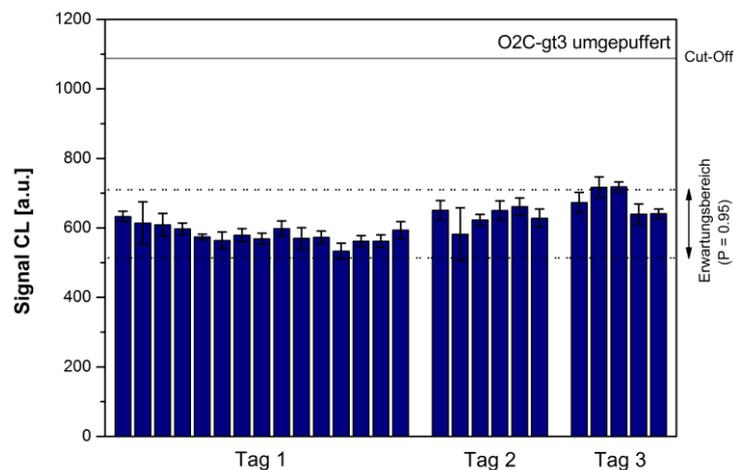


Abbildung 3.26: Darstellung der Mehrtagesstudie zur Etablierung eines Cut-Off-Niveaus für den Nachweis von anti-HEV IgG in Schweineseren auf Basis von Antigen O2C-gt3, gespottet nach Pufferaustausch in SDS-freien Spottingpuffer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz ($m = 5$)

Die Wiederholbarkeit der Signale an den einzelnen Tagen zeigt mit Streuungen zwischen 4,3 - 5,7 % eine sehr hohe Wiederholpräzision der Messungen, die im Bereich der Werte für die verdünnte Lösung von O2C-gt1 liegt. Da die über alle Messtage hinweg ermittelte Varianz zu einem relativ eng umgrenzten Erwartungsbereich von 610 ± 100 a.u. führt, wurde auch für O2C-gt3 ein allgemeingültiger Cut-Off-Wert auf Grundlage aller Messwerte ermittelt. Dieser liegt wegen der etwas größeren Streuung mit 1.090 a.u. leicht über den Cut-Off-Werten für das Antigen O2C-gt1.

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der HEV-Immuno-chips für Antigen O2C-gt3. Die Berechnung basiert auf insgesamt 26 ($n = 26$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die fünf Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | O2C-gt3 umgepuffert | | |
|---------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] |
| Tag 1 | 582 | 3,9 | 4,3 |
| Tag 2 | 633 | 5,4 | 4,5 |
| Tag 3 | 678 | 3,4 | 5,7 |
| gesamt | 612 | 4,2 | 7,8 |

Messungen mit *Yersinia*-Antigen YopD

Die Messungen zur Etablierung eines Cut-Off-Wertes für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG wurden mit Serum Y 21 durchgeführt, welches mittels des als Referenz dienenden ELISA-Kits *pigtype* *Yersinia* Ab (1) von Qiagen als seronegativ beurteilt worden war. Hier muss erwähnt werden, dass bei diesem Mikrotiterplatten-Assay nicht bekannt ist, auf welchem Antigen der Test beruht. Laut Herstellerangaben wurde ein Gemisch von Yop-Antigenen immobilisiert, der Assay ist somit nicht Antigen-spezifisch.

Es wurden über drei Messtage hinweg insgesamt 20 Messungen mit Serum Y 21 analysiert und daraus ein Cut-Off-Wert berechnet. In Abbildung 3.27 sind die Blindprobenmessungen veranschaulicht, die statistischen Parameter der Mehrtagesstudie sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Die gemessenen CL-Signale der Spots liegen analog zu den HEV-Messungen etwas über dem unspezifischen Signalhintergrund, was auch für das für die Yersinien-Diagnostik gewählte Serum eine leichte Seroreaktivität indiziert. Die Signalschwankungen sind etwas höher als die Streuungen, die mit den HEV-Antigenen ermittelt wurden. Die Intra-Day-Varianz variiert an den einzelnen Messtagen zwischen 6 - 13 %, wobei bei Bezug auf alle Messwerte dennoch ein akzeptabler Erwartungsbereich ($P = 0,95$) von 500 ± 100 a.u. resultiert, welcher einer zu erwartenden Abweichung der Signale von 20 % entspricht. Da nur ein einziger Messwert diese Grenze geringfügig verletzt, ist somit die Einführung eines allgemeingültigen Cut-Off-Niveaus auf Basis dieser Mehrtagesstudie vertretbar. Der resultierende Cut-Off-Wert für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG ergibt sich zu einem Schwellenwert von 980 a.u. und

befindet sich damit in einem ähnlichen Signalbereich wie die für die HEV-Analytik berechneten Cut-Off-Werte.

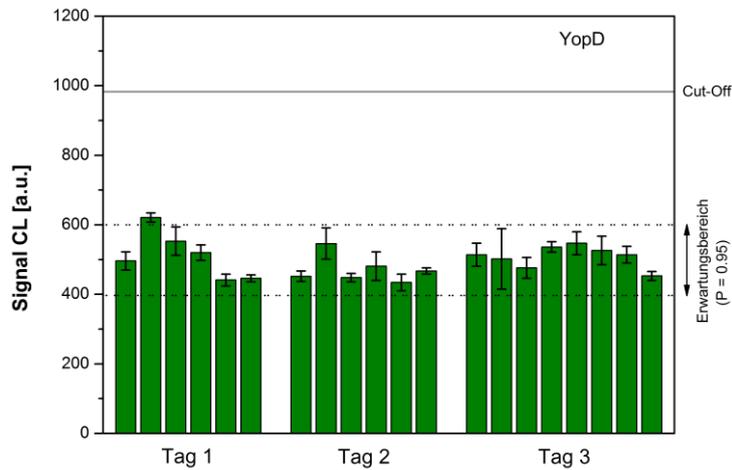


Abbildung 3.27: Darstellung der Mehrtagesstudie zur Etablierung eines Cut-Off-Niveaus für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG in Schweineseren auf Basis von Antigen YopD. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der statistischen Parameter der Mehrtagesstudie zur Charakterisierung der *Yersinia*-Immuno-chips für Antigen YopD. Die Berechnung basiert auf insgesamt 20 ($n = 20$) einzelnen Messungen und Mittelwerten für die Replikat-Spots ($m = 5$).

| Messtag | YopD | | |
|---------------|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MW [a.u.] | CV _{Intra-Assay} [%] | CV _{Inter-Assay} [%] |
| Tag 1 | 513 | 4,2 | 13,3 |
| Tag 2 | 471 | 5,0 | 8,5 |
| Tag 3 | 509 | 6,8 | 6,1 |
| gesamt | 499 | 5,5 | 9,7 |

Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Mehrtagesstudien mit Blindproben für beide Zielanalyten die Reproduzierbarkeit der Herstellung des Immunochips bestätigen und die Leerwert-Messungen stabile Messsignale mit geringen Variationskoeffizienten erbringen.

Auf dieser Basis konnten Messtag-unabhängige, allgemeingültige Cut-Off-Werte für die einzelnen Antigene eingeführt werden, die einen Bezugspunkt für die weitere Charakterisierung des Immunochips hinsichtlich seines Ansprechverhaltens und Nachweisvermögens darstellen.

Dabei ist die zehnfache Standardabweichung als Berechnungsgrundlage für das Cut-Off-Niveau in Bezug auf die Reproduzierpräzision des Chip-basierten Immunoassays mit Sicherheit sehr defensiv gewählt, da die Entscheidungsgrenzen deutlich oberhalb der jeweils gemessenen Maximalsignale liegen und die Erwartungsbereiche keine deutlichen Signalausreißer vorsehen. Allerdings beziehen sich die Schwellenwerte lediglich auf ein Serum als Blindproben-Matrix und die Messungen erfüllen somit nicht das Kriterium, natürliche Matrixeinflüsse mit Hilfe der Messung verschiedener negativer Proben zu berücksichtigen. Daher soll ein bewusst höher gesetzter Cut-Off-Wert die Generierung von falsch-positiven Befunden verhindern. Die Einführung der Cut-Off-Schwellen des Immunochips erlaubt es, das Nachweisvermögen dieses neuen Immunoassays zur Detektion von Antikörpern gegen Zoonoseerreger mit anderen immunologischen Verfahren zu vergleichen. Die Anwendbarkeit dieser Methode zur Definition des Cut-Off-Wertes wurde in Form von Verdünnungsexperimenten und eines Serenscreenings erprobt.

3.3.2 Titrationsversuche zur Ermittlung des Ansprechverhaltens des Immunochips

Für qualitative Screening-Methoden genügt nach 2002/657/EG neben der Überprüfung der analytischen Methode hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Spezifität die Definition des Nachweisvermögens CC_{β} , für qualitative Bestätigungsmethoden ist darüber hinaus die Einführung der Entscheidungsgrenze CC_{α} verlangt. Die Etablierung einer quantitativen Methode sieht dagegen die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit mittels Kalibrierung und Wiederfindungsraten vor.

Da für den qualitativen Nachweis von Serumantikörpern die Kriterien für die Bestimmung von CC_{α} und CC_{β} nicht erfüllt werden können, ist es für das Anwendungsziel des

Immuno-chips dennoch wichtig, das Ansprechverhalten des Assays, d.h. die analytische Sensitivität, zu kennen. Für die Überprüfung des Verfahrens, nach dem der Cut-Off-Wert als Entscheidungsgrenze für einen positiven Befund definiert wurde, ist es von großem Interesse zu wissen, welches Signal-zu-Konzentrations-Verhalten (*dose-response*) gerade im Signalbereich des Cut-Off-Niveaus vorliegt. Grundsätzlich kann wie bei allen Immunoassays auf Basis der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung davon ausgegangen werden, dass ein exponentielles Signalverhalten vorliegt, welches bei halblogarithmischer Auftragung einen dynamischen Bereich mit asymptotischen Verhalten bei sehr niedrigen bzw. sehr hohen Analytgehalten zeigt. Für die Evaluation eines qualitativen Nachweises ist es jedoch nicht von Bedeutung, bei welcher Analyt-Konzentration sich der Testmittelpunkt des sich ergebenden sigmoidalen Fits der 4-Parameter-logistischen Funktion befindet, da eine Aussage über eine definitive Analyt-Konzentration nicht erforderlich ist. Daher muss keine Definition über den für eine quantitative Aussage verwertbaren Arbeitsbereich der Kalibrierkurve geliefert werden. Dagegen ist das Ansprechverhalten am definierten Cut-Off-Niveau sehr wichtig, um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit kleine Änderungen im Analytgehalt der Probe einen Unterschied im Befund der Analyse machen. Steigt das Signal bei Konzentrationen oberhalb der Entscheidungsgrenze sehr schnell an, so verringert sich das Risiko von falsch-positiven Befunden, weil das Signal sehr bald außerhalb der natürlichen Streuung von Leerwert-Proben liegen sollte. Eine hohe Sensitivität des Assays im Bereich der Entscheidungsgrenze, d.h. des Cut-Off-Wertes, ist also wünschenswert. Gleichzeitig ist auch die Höhe des Schwellenwertes in Bezug auf die Analyt-Konzentration für eine Screening-Methode von Bedeutung, da sie im Vergleich verschiedener Methoden zeigt, wie nachweisstark der entwickelte Assay ist. Wenn für die gesuchten Analyten nicht mit absoluten Konzentrationen gearbeitet werden kann, werden in der Serundiagnostik häufig relative Einheiten eingeführt, die einer seropositiven Probe willkürlich zugeordnet werden. Dadurch ergibt sich bei einem Screening für alle Proben ein relativer Bezug, über den die Antikörper-Titer verschiedener Proben über den Positiv- oder Negativ-Befund hinaus verglichen und klassifiziert werden können.

Verdünnungsexperimente auf Basis von Realseren können durch den fehlenden Bezug auf absolute Konzentrationswerte begrifflich nicht einer Kalibrierung mit dotierten Proben oder referenzierten Standards gleichgesetzt werden, entsprechen in der Form ihrer Durchführung jedoch einer Kalibrierung und werden im Folgenden als Titration bezeichnet.

3.3.2.1 Methoden zum Vergleich des Ansprechverhaltens des Immuno칩s

Wie oben angesprochen, ist es bei der Arbeit mit Realseren nicht möglich, dem Cut-Off-Wert eine korrespondierende absolute Analytmenge zuzuordnen und auf dieser Basis verschiedene Nachweismethoden zu vergleichen. Um dennoch das Potenzial einer neuen Methode untersuchen zu können, kann für qualitative Verfahren allerdings ein relativer Bezug hergestellt werden, indem die Übereinstimmung der Befunde auf Basis der gleichen Proben ermittelt wird. Hierfür ist entscheidend, wie die Entscheidungsgrenze der jeweiligen Methode eingestellt wurde. Die analytische Sensitivität der Assays kann dann durch Normierung der Absolutsignale auf ihren jeweiligen Cut-Off-Wert vergleichend untersucht werden.

Um den Immuno칩 zu charakterisieren, wurde für die HEV-Analytik auf den für die Schweineseren adaptierten kommerziellen LIA-Test *recomLine HEV IgG/IgM* des Projektpartners Mikrogen zurückgegriffen. Hier wurde statt des HRP-markierten Detektionsantikörpers für humane IgG-Antikörper ein Konjugat, welches porcine IgGs erkennt, verwendet. Für die Untersuchung von Schweineseren ist dieser Test damit nicht validiert, dennoch bietet der kommerzielle Teststreifen an sich eine verlässliche Vergleichsgrundlage. Der Teststreifen enthält eine Cut-Off-Bande, d.h. im Gegensatz zu den Mikrotiterplatten-basierten Immunoassays wird das Cut-Off-Niveau nicht über Kontrollseren bestimmt, sondern durch die Reaktivität einer Kontrollbande mit den einzelnen Proben. Die Signale der spezifischen Antigenbanden werden auf diese Kontrollbande normiert. Die Reaktivität der Kontrollbande wurde dabei so eingestellt, dass eine Diskriminierung von positiven und negativen Befunden auf Basis des resultierenden Farbsignals möglich ist und nach Überprüfung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität somit einen Cut-Off-Signalwert liefert. Da dieser für die humane Diagnostik validiert wurde, ist der Bezug auf diesen Cut-Off-Wert, der von Mikrogen als Cut-Off-Index (COI) bezeichnet wird, lediglich ein Richtwert für die Analyse von Schweineseren. Dieser adaptierte LIA diente jedoch auch als Referenz bei der Etablierung des von Mikrogen entwickelten und mittlerweile über Prionics vertriebene ELISA-Kits *PrioCheck® HEV porcine* und stellt somit eine geeignete Vergleichsplattform dar. Für die Auswertung der Bandenfärbungen werden die inkubierten Teststreifen nach Trocknung eingescannt und die Färbung mit Hilfe der Software *recomScan* (Mikrogen) in Graustufenwerte umgerechnet.

Als dritte Immunoassay-Plattform wurde ein konventioneller ELISA verwendet. Da das Prionics-Kit auf einer Mischung verschiedener Antigene basiert, konnte es für einen Antigen-

spezifischen Test nicht eingesetzt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit eigene ELISAs entwickelt (siehe Kapitel 3.1.2), mit denen sowohl für die HEV-Analytik mittels O2C-gt1 und O2C-gt3 als auch für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG mittels YopD ein Antigen-spezifischer Vergleich mit der ImmunoChip-Methode möglich war. Die Qualität des HEV-Immunoassays konnte dabei mit Hilfe von Kontrollseren des kommerziellen Prionics-Tests überprüft werden. Hier konnten mit den optimierten Assay-Bedingungen die Qualitätskriterien, welche durch Vorgaben des Herstellers zur Gültigkeit des Tests bezogen auf die Absolutsignale der Negativ-, Cut-Off- und Positivkontrollen aufgestellt werden, in allen Experimenten eingehalten werden. Für die Definition der Cut-Off-Grenze des eigenen ELISA-Tests wurde in den weiteren Experimenten analog zur LIA-Methode und zum ImmunoChip die Blindprobe H 27 in Mehrfachbestimmung gemessen und der Cut-Off-Wert nach Gleichung 3.1 berechnet. Diese Versuchsdurchführung und Bestimmung des Cut-Off-Wertes wurde für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG übernommen, wobei als Blindprobe das Serum Y 21 diente. Um auch für den Nachweis von Yersinien-Antikörpern einen dritten Vergleichspunkt zu erhalten, wurde ein weiterer stationärer Immunoassay eingesetzt. Hier konnte auf das kommerziell verfügbare ELISA-Kit *pigtype* *Yersinia* Ab (1) von Qiagen zurückgegriffen werden, welches für das Screening von porcinen Seren- und Fleischsaftproben validiert ist. Da bei diesem Assay wie bei den meisten kommerziellen Assays ein Gemisch von Antigenen – in diesem Fall ein nicht genauer definiertes Gemisch von Yop-Antigenen – verwendet wird, ist bei diesem Assay keine spezifische Aussage über die Reaktivität von YopD möglich, dennoch bietet dieser Test eine hilfreiche Vergleichsmöglichkeit. Die Cut-Off-Grenze des Tests wird als relativer Quotient Q mit Hilfe von mitgelieferten Negativ- und Positivkontrollen bestimmt.

$$Q = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Negativkontrolle}}}{OD_{\text{Positivkontrolle}} - OD_{\text{Negativkontrolle}}} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Proben, welche einen Quotienten von über 0,3 ergeben, werden als seropositiv für anti-*Yersinia* IgG gewertet. Für den Methodenvergleich werden die mit diesem Test erhaltenen Absorptionswerte der Proben durch 0,3 geteilt, um die Normierung auf den Cut-Off-Wert vorzunehmen.

Über die Normierung auf ihre jeweiligen Cut-Off-Werte können also alle eingesetzten Methoden miteinander verglichen und Aussagen über die Lage des Cut-Off-Niveaus bezogen auf relative Antikörperkonzentrationen und Assay-Sensitivitäten getroffen werden.

3.3.2.2 Auswahl eines geeigneten Verdünnungsmediums für die Titrationsexperimente

Für die Titrationsexperimente war zunächst zu klären, wie die Verdünnungsreihen angesetzt werden sollten. Dazu wurden Voruntersuchungen am Beispiel des Nachweises von anti-HEV IgG durchgeführt.

Um einen möglichst großen Konzentrationsbereich abzudecken, wurde ein Serum ausgewählt, welches im vorgeschalteten Screening mittels LIA einen sehr hohen Titer aufwies (H 2). Für die Verdünnung sollte im Idealfall eine Matrix verwendet werden, welche eine möglichst ähnliche Zusammensetzung aufweist, gleichzeitig aber Analyt-frei ist. Hier stellte sich also die gleiche Frage, wie sie bereits für die Blindprobenmessungen diskutiert wurde. Wie in diesem Zusammenhang erwähnt, stand neben dem Serum H 27, das im LIA keine Farbreaktion zeigte, noch ein Realserum zur Verfügung, dem mittels Immunofiltration alle IgG-Antikörper entzogen worden waren und einen Anteil von 30 % (v/v) HEPES-Puffer aufwies. Diese Matrix weicht somit deutlich von den realen Bedingungen ab, bietet aber die Möglichkeit, durch Vergleich des resultierenden Ansprechverhaltens evtl. auftretende Interferenzen durch Matrixeffekte zu erkennen. Daher wurde sowohl eine Verdünnungsreihe des stark-positiven Serums H 2 mit Serum H 27 als auch mit dem Antikörper (AK)-freien Serum hergestellt und die Ergebnisse für die HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 am MCR 3 verglichen. Für die Experimente wurden die Verdünnungsstufen 1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100 und 1:1.000 angesetzt und jede Verdünnungsstufe auf beiden Flusszellen eines Immunochips gemessen. Für die Auftragung wurden die relativen Antikörperkonzentrationen zur besseren Veranschaulichung in eine Prozentskala überführt, ausgehend von 100 % für die reine Serumprobe H 2 in der Standardverdünnung von 1+100 in PBST. Die resultierenden CL-Signale sind in Abbildung 3.28 aufgetragen und das Ansprechverhalten mittels 4-Parameter-logistischem Fit verdeutlicht.

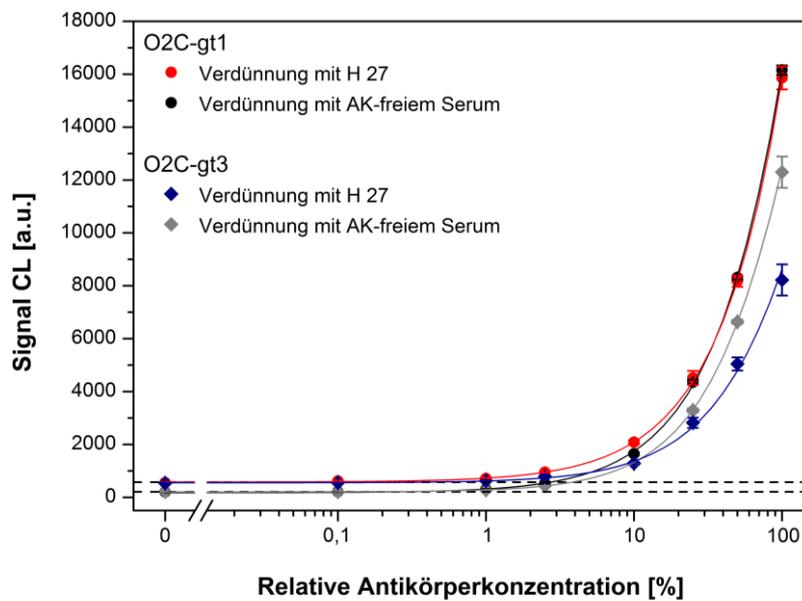


Abbildung 3.28: Vergleich des Ansprechverhaltens des Immunochips auf Basis der HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 bei Verdünnung des stark positiven Serums H 2 mit dem Blindproben-Serum H 27 bzw. der nach Immunofiltration Antikörper-freien Serummatrix. Die Fehlerbalken repräsentieren die Streuung der gemittelten Signale bezogen auf die pro Verdünnungsreihe gemessenen zwei Flusszellen eines Immunochips ($m = 2$, $n = 8$).

Bei der Beurteilung der erhaltenen *Dose-Response*-Kurven müssen zunächst wieder die Gegebenheiten für die beiden rekombinanten Antigene berücksichtigt werden. Aufgrund der höheren Signalschwankungen für O2C-gt3 ist es nachvollziehbar, dass sich das Absolutsignal bei Messungen von hohen Antikörper-Konzentrationen nicht exakt reproduzieren lässt. Die Messungen mit O2C-gt3 können daher nur für die Aussagen im Bereich des unteren Sättigungsbereiches belastbar diskutiert werden. Für beide Antigene wird generell deutlich, dass mit dem nach LIA-Test hochpositiven Serum H 2 deutlich höhere Absolutsignale erreicht werden als mit dem für die Stabilitätstests verwendeten Serum H 12, das im mittleren COI-Bereich der LIA-Tests liegt. Dies ist bereits ein Indiz für eine hohe Sensitivität des Immunochip-Assays.

Der Vergleich der Signale und der Kurvenverläufe auf Basis von O2C-gt1 zeigt, dass sich im Bereich hoher Antikörper-Titer (100 % - 25 %) trotz der geringen Zahl an Messungen ein fast identisches Signalverhalten für die beiden Verdünnungsmatrizes ergibt. Daraus kann gefolgert werden, dass sich durch die Verwendung der Originalmatrix keine Störeffekte auf das Ansprechverhalten im Vergleich zu einer Antikörper-aufgereinigten Matrix ergeben. Hohe Kreuzreaktivitäten der Antigene mit „falschen“ IgG-Antikörpern würden sich in diesem Fall

durch erhöhte Spot-Signale für die Messungen mit H 27 im Vergleich zur Antikörper-freien Verdünnungsmatrix nachweisen lassen.

Werden dagegen die Signale im niedrigen Konzentrationsbereich verglichen, so wird hier mit größer werdendem Matrixanteil des Verdünnungsmediums ein Unterschied in den Kurvenverläufen deutlich. Bei Verdünnung mit dem Antikörper-freien Serum wird sowohl für O2C-gt1 als auch für O2C-gt3 ein niedrigeres unteres Sättigungsniveau erreicht. Die Reduzierung des Antikörpergehaltes der Proben führt zu geringeren Signalen, die ab einer 1:100-Verdünnung der positiven Probe im Bereich der Signale für die jeweiligen Blindproben liegen. Der Unterschied in den Absolutsignalen, die mit Serum H 27 bzw. der Antikörper-freien Probe als Verdünnungsmatrix erzielt werden, ist in Abbildung 3.28 in Form von gestrichelten Linien verdeutlicht. Das Signalniveau für Serum H 27 liegt in Übereinstimmung mit den Blindprobenmessungen für beide HEV-Antigene im Bereich von 600 a.u., für das aufgereinigte Serum werden dagegen Signale von lediglich ca. 200 a.u. erreicht. Dieses Signal liegt damit auch unterhalb der Hintergrundsignale von ca. 250 – 300 a.u., die auf der nicht mit Antigenen belegten Chipoberfläche mit allen Realseren gemessen wurden. Dies bestätigt, dass durch die Entfernung der Antikörper der natürliche unspezifische Signalhintergrund vermindert wird und dadurch Messungen auf Basis eines solchen Probenmediums zu unrealistisch niedrigen Cut-Off-Werten führen würden. Aus dem Signalunterschied kann weiterhin keine definitive Aussage darüber getroffen werden, ob die gegenüber dem Hintergrund erhöhten Signale auf den Spotflächen bei Messung von Serum H 27 spezifischer oder unspezifischer Natur sind, da sowohl die Existenz von geringen Mengen an anti-HEV IgG als auch eine kreuzreaktive Bindung anderer Antikörper die Spot-Signale erhöhen kann. Aufgrund der Ergebnisse wurde für die vergleichende Analyse des Ansprechverhaltens im Fall der HEV-Diagnostik das Serum H 27 als Verdünnungsmatrix verwendet und für die Yersinien-Analytik das im als Referenz dienenden ELISA-Test *pigtype* Yersinia Ab (1) seronegativ beurteilte Serum Y 21.

3.3.2.3 Vergleichende Untersuchung des Ansprechverhaltens von Immunoassays zum Nachweis von anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG

Im Folgenden werden die Experimente zur Charakterisierung des Ansprechverhaltens des Immuno-chips im Vergleich zu stationären Immunoassays beschrieben und diskutiert. Die bei den Verdünnungsreihen erhaltenen CL-Signale beziehungsweise Absorptionswerte wurden

auf die jeweiligen Cut-Off-Werte normiert und können dadurch für den Vergleich in einem Graphen dargestellt werden. Für die statistische Beurteilung muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen der Prinzipstudie nur eine begrenzte Zahl an Wiederholexperimenten durchgeführt wurde, da die Menge an Serum für die Tests limitiert war.

Titrationsexperimente für den Nachweis von anti-HEV IgG

Die Charakterisierung des Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays (CL-MIA) auf Basis des Immuno-chips wurde mittels Titration von Serum H 2, welches mit Serum H 27 verdünnt wurde, durchgeführt und mit den Ergebnissen des LIA-Tests und des eigenen ELISAs auf Basis des Antigens O2C-gt1 verglichen. Die auf ihre jeweiligen Cut-Off-Werte normierten relativen Signale und ihre korrespondierenden *Dose-Response*-Kurven sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

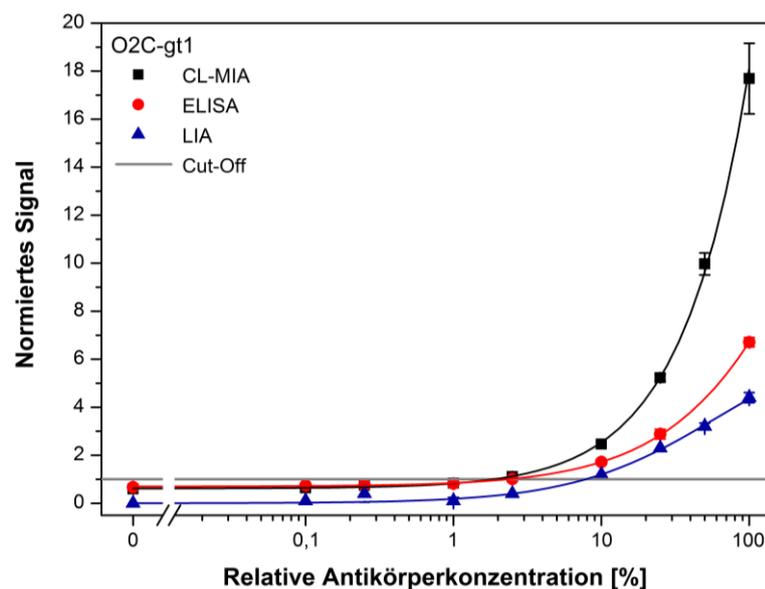


Abbildung 3.29: Vergleich des Ansprechverhaltens für O2C-gt1 anhand der Titration von Serum H 2 und Verdünnung mit Serum H 27 (CL-MIA: m = 2, n = 8; ELISA: m = 3, n = 8; LIA: m = 2, n = 9).

Die Evaluation der Ergebnisse erlaubt verschiedene Aussagen über die Immuno-chip-Methode in Relation zu den beiden stationären Assays.

Betrachtet man die Kurvenverläufe in Hinblick auf ihre Schnittpunkte mit dem nach Normierung einheitlich auf 1,0 gesetzten Cut-Off-Level, so ergeben sich sehr vergleichbare

Schnittpunkte für den ELISA-Test und den CL-MIA, während das Cut-Off-Level für den LIA bei einer deutlichen höheren Antikörper-Konzentration liegt.

Die Analogie für ELISA und CL-MIA entspricht dabei der Erwartung, da bei vergleichbarer Standardabweichung aufgrund der für beide angewendeten Berechnung des Cut-Off-Wertes nach Gleichung 3.1 auch ein auf die Blindprobe bezogener ähnlicher Schwellenwert resultieren sollte. Dieser entspricht für beide Methoden einer Verdünnung von ca. 1:40 des Serums H 2. Bei dieser Verdünnungsstufe ist das Cut-Off-Niveau für den LIA-Test dagegen bereits deutlich unterschritten und der korrespondierende Titer würde zu einem negativen Befund führen. Der Schwellenwert für eine Positiv-Negativ-Diskriminierung mittels LIA liegt bei einer Verdünnung von ca. 1:10 und damit beinahe bei einer vierfach höheren Konzentration. Dieser deutliche Unterschied in der Lage der Cut-Off-Werte wirft die Frage auf, ob die Cut-Off-Definition für den Immunochip richtig gewählt wurde. Diese Frage konnte im Rahmen einer Prinzipstudie nicht eindeutig geklärt werden, da hierfür zu wenige Proben untersucht werden konnten, um verlässliche Seroprävalenzstudien mit vergleichenden Daten zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität zu generieren. Allerdings lässt sich bei Berücksichtigung des über die zehnfache Standardabweichung berechneten, bewusst vorsichtig gewählten Schwellenwerts schließen, dass der CL-Mikroarray ein höheres Nachweisvermögen aufweist als der Streifentest. Es erscheint zumindest sehr unwahrscheinlich, dass das in Abbildung 3.30 abgebildete Spotsignal für die Verdünnungsstufe 1:10 mit einem SNR von ca. 6:1 auf unspezifische Bindungen zurückgeht und nicht einen positiven Nachweis von anti-HEV IgG erbringt.

Die Messbilder wurden für die optische Darstellung auf eine einheitliche Signalintensität von 5.000 a.u. normiert und anschließend zur besseren Darstellung in eine Farbskala überführt, welche von weiß für hohe Signale bis tiefrot für niedrige Signale reicht. Das Signal der 1:10-Verdünnung hebt sich deutlich von den Signalen der Blindprobe H 27 ab und ist auch deutlich von den Signalen der 1:40-Verdünnung unterscheidbar, welche fast exakt dem für O2C-gt1 berechneten Cut-Off-Wert entsprechen.

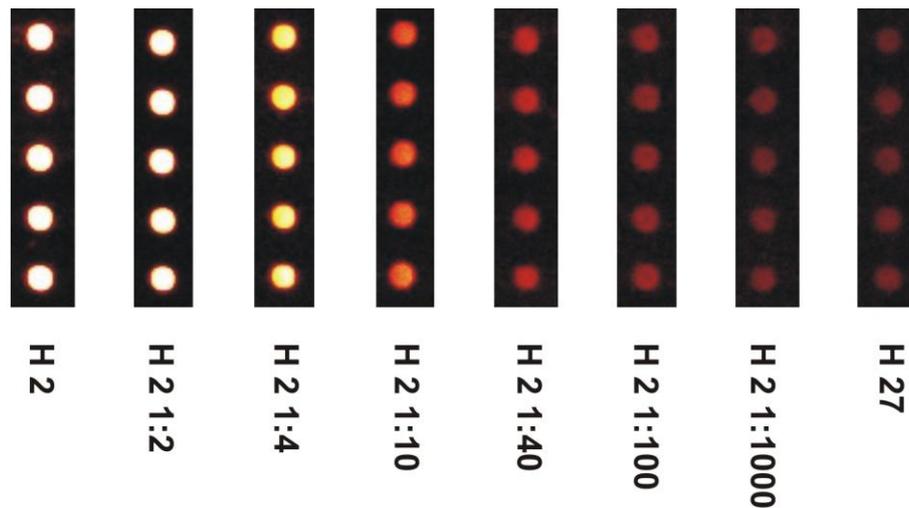


Abbildung 3.30: Darstellung der Verdünnungsreihe anhand der Replikat-Spots für O2C-gt1 (1:2-Verdünnung des Antigens). Die Aufnahmen der CCD-Kamera wurden zur besseren Beurteilung der Helligkeiten nachträglich eingefärbt.

Die gezeigten Bilder der CCD-Kamera liefern einen optischen Eindruck von der Sensitivität des Mikroarray-basierten Immunoassays. Vergleicht man die normierten Signalwerte der drei verschiedenen Assay-Plattformen, so wird deutlich, dass mit Hilfe des Immunochips ein viel größerer dynamischer Signalbereich abgedeckt wird als dies mit den beiden stationären Assays möglich ist. Dies spiegeln die mit der unverdünnten Probe H 2 erreichten maximalen Signale wider, welche für den Immunochip dem ca. 17-fachen Cut-Off-Wert entsprechen, während für die LIA-Methode nur der ca. vierfache Cut-Off-Wert gemessen wird. Die resultierenden Kurvenverläufe ergeben damit auch an den jeweiligen Cut-Off-Schwellen unterschiedliche Steigungen. Hier weist der LIA zwar direkt an seiner Cut-Off-Grenze eine höhere Steigung auf als der CL-MIA an seinem Schwellenwert, wird jedoch als gemeinsame Vergleichsgrundlage die korrespondierende Verdünnungsstufe von ca. 1:10 des LIA-Tests herangezogen, so kann an diesem Schnittpunkt die höchste Steigung für die Immunochip-Methode festgestellt werden.

Aufgrund der ermittelten hohen Sensitivität des Chip-basierten Nachweisverfahrens ist der Immunochip folglich am besten dazu geeignet, neben der Positiv/Negativ-Diskriminierung auch eine Abschätzung über den Titer einer seropositiven Probe zu treffen und damit eine Klassifizierung der Seren in schwach- oder stark-positive Seren vorzunehmen.

Titrationsexperimente für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG

In Analogie zu den Tests mit HEV-Antigenen wurde auch für den Nachweis von Yersinien-Antikörpern ein stark-positives Serum (Y 1) ausgewählt und mit dem entsprechenden Blindproben-Serum Y 21 verdünnt. Die Proben wurden mittels CL-MIA auf Basis von YopD, einem eigenen Mikrotiterplatten-ELISA, der ebenfalls mit YopD beschichtet wurde, und des kommerziellen ELISA-Kits *pigtype* Yersinia Ab (Qiagen), welches ein Gemisch von Yop-Antigenen verwendet, untersucht. Die Ergebnisse der Titrationsreihen sind in normierter Auftragung in Abbildung 3.31 gezeigt.

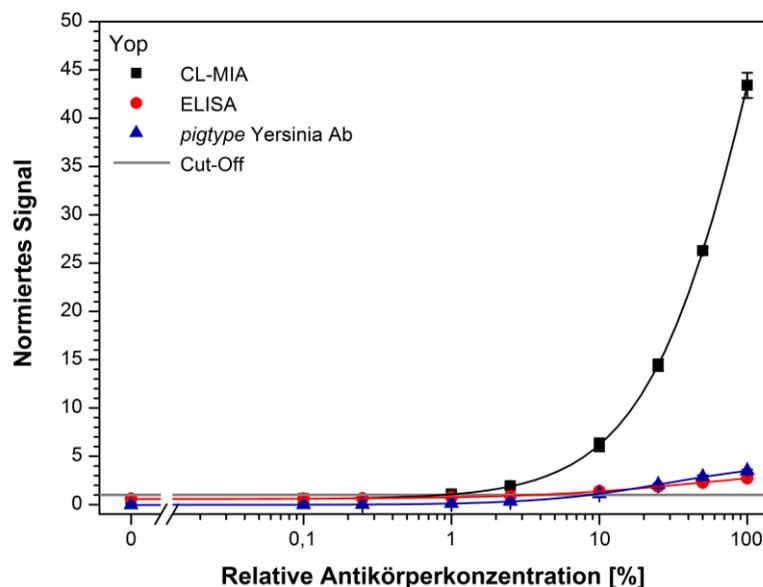


Abbildung 3.31: Vergleich des Ansprechverhaltens für Yop-Antigene anhand der Titration von Serum Y 1 und Verdünnung mit Serum Y 21 (CL-MIA: $m = 2$, $n = 8$; ELISA: $m = 3$, $n = 8$; *pigtype* Yersinia: $m = 3$, $n = 9$).

Auch für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG werden die Vorteile des Immuno-chips deutlich. Wie bei der HEV-Analytik können auch die Yersinien-Antikörper im CL-MIA in deutlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Bezogen auf die Cut-Off-Werte ist der Immuno-chip-Assay beiden stationären Assays überlegen. Während für diese bei einer Verdünnung des Serums Y 1 um ca. den Faktor zehn der jeweilige Cut-Off-Wert bereits unterschritten wird, ist bei dieser Verdünnungsstufe ein noch sehr deutliches CL-Signal messbar. Der Schwellenwert für einen positiven Befund mittels Immuno-chip wird erst bei einer Verdünnung von ca. 1:100 erreicht.

Der Vergleich der Steigungen der Kurven unterstreicht ebenfalls das Potenzial des Immunochips, der im Gegensatz zu den Referenz-ELISA-Tests eine hohe Sensitivität der Methode beweist und bei maximaler Antikörper-Konzentration das über 40-fache des Cut-Off-Wertes erreicht, während die anderen Assays maximal die drei- bis vierfache Absorption bezogen auf das Cut-Off-Niveau zeigen.

Fazit

Das für beide Zoonose-Antikörper beschriebene Signalverhalten macht das große Potenzial des Durchfluss-Assays in Verbindung mit der nachweisstarken Chemilumineszenz-Auslesung deutlich. Es kann innerhalb von weniger als neun Minuten ein sensitiver Nachweis über die Existenz von Antikörpern gegen verschiedene zoonotische Antigene geführt werden. Dabei erlaubt der CL-MIA die Identifikation von anti-HEV IgG in einer vierfach niedrigen Konzentration, den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG in einer zehnfach niedrigeren Konzentration als die Referenzmethoden. Aufgrund der Multiplex-Fähigkeit des Mikroarray-Prinzips kann darüber hinaus bei Verfügbarkeit spezifischer Antigene nicht nur für eine einzelne Analyse Zeit eingespart werden, sondern durch simultane Bestimmung mehrerer Zielantikörper der Aufwand für eine umfassende Erfassung über die gewünschten Seroprävalenzen im Vergleich zum aktuellen Stand der Technik deutlich reduziert werden.

Zwar steht bei der Diagnostik eine semiquantitative Beurteilung des Antikörper-Titers nicht im Vordergrund, dennoch bietet die Immunochip-Methode den zusätzlichen Vorteil, eine semiquantitative Aussage über die vorliegende Antikörpermenge und nützliche Informationen z.B. über den Infektionsverlauf zu liefern. Hier sind die Reaktivitäten der getesteten stationären Assays so eingestellt, dass stark-positive Seren sehr schnell im Bereich der Farbsättigung des TMB-Substrates liegen und somit differierende Titer nicht mehr unterscheidbar sind. Der große dynamische Bereich der CL-Detektion gewährleistet dagegen bei den Titrationsexperimenten selbst für hochpositive Seren eine Detektion im linearen Bereich, da die höchsten gemessenen Graustufenwerte lediglich im Bereich der halbmaximalen Sättigung des 16-bit CCD-Chips lagen.

Da mit Hilfe der vergleichenden Titrationsexperimente für den Immunochip die Cut-Off-Schwellen bei den niedrigsten Antikörper-Konzentrationen ermittelt werden konnten, lässt sich für das abschließend durchzuführende Serenscreening erwarten, dass der Immunochip folglich auch mehr positive Befunde liefern sollte als die Referenzmethoden.

3.3.3 Screening von Schweineseren auf IgG-Antikörper gegen HEV und *Yersinia* spp.

Nachdem der Immunochip hinsichtlich seiner Signalstabilität überprüft, Schwellenwerte für einen Positivbefund etabliert und die Sensitivität des CL-MIA vergleichend analysiert worden war, sollte als Abschluss der Prinzipstudie die Anwendbarkeit der neuen Methode in Form eines vergleichenden Serenscreenings getestet werden.

Hierfür wurden die für die HEV bzw. Yersinien-Diagnostik vorgetesteten Seren mit den jeweils drei zur Verfügung stehenden Immunoassay-Plattformen untersucht und die Befunde verglichen. Aufgrund der Tatsache, dass für die Etablierung der Immunochip-Methode bei dem vorgeschalteten Screening von Realproben darauf geachtet worden war, dass viele seropositive Proben zur Verfügung standen, war bereits im Vorhinein eine hohe Positiv-Befundrate zu erwarten. Gleichzeitig ist es generell aufgrund der hohen Seroprävalenz für anti-HEV IgG schwierig, an eine größere Zahl an seronegativen Proben zu gelangen.

Insgesamt wurden 27 Realseren auf anti-HEV IgG untersucht, 21 Seren wurden auf anti-*Yersinia* IgG getestet. Die Ergebnisse dieser Tests werden im Folgenden diskutiert. Um neben der Analyse der Seren auf Basis von Antikörper-spezifischen Antigenen auch einen ersten Hinweis über die Multiplex-Fähigkeit des Mikroarray-Chips zu erhalten, wurden die 21 für die Yersinien-Analytik ausgewählten Seren gleichzeitig auf HEV-Antikörper untersucht und die Methode auf mögliche Kreuzreaktivitäten der rekombinanten Antigene überprüft.

Die Messungen mittels Immunochip wurden an verschiedenen Messtagen durchgeführt.

3.3.3.1 Screening von Schweineseren auf anti-HEV IgG

Das Screening der Schweineseren auf anti-HEV IgG mittels Immunochip wurde mit den Ergebnissen mit Hilfe des adaptierten LIA-Tests *recomLine* HEV IgG/IgM und den eigenen ELISA-Tests auf Basis der Antigene O2C-gt1 bzw. O2C-gt3 abgeglichen. Dabei wurde jedes Serum mit dem Immunochip und dem Teststreifen einfach gemessen, der ELISA-Test wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Neben den 27 Schlachthof-Proben wurden das Antikörper-aufgereinigte Serum und eine kommerziell erhältliche Serumprobe (Biowest), die nach Blutprobenahme während des Schlachtprozesses an einem französischen Schlachthof eine gepoolte Probe verschiedener Individuen darstellt, getestet. Die Ergebnisse des vergleichenden Screenings sind überblicksmäßig als 3D-Säulendiagramm in Abbildung 3.32 zusammengefasst.

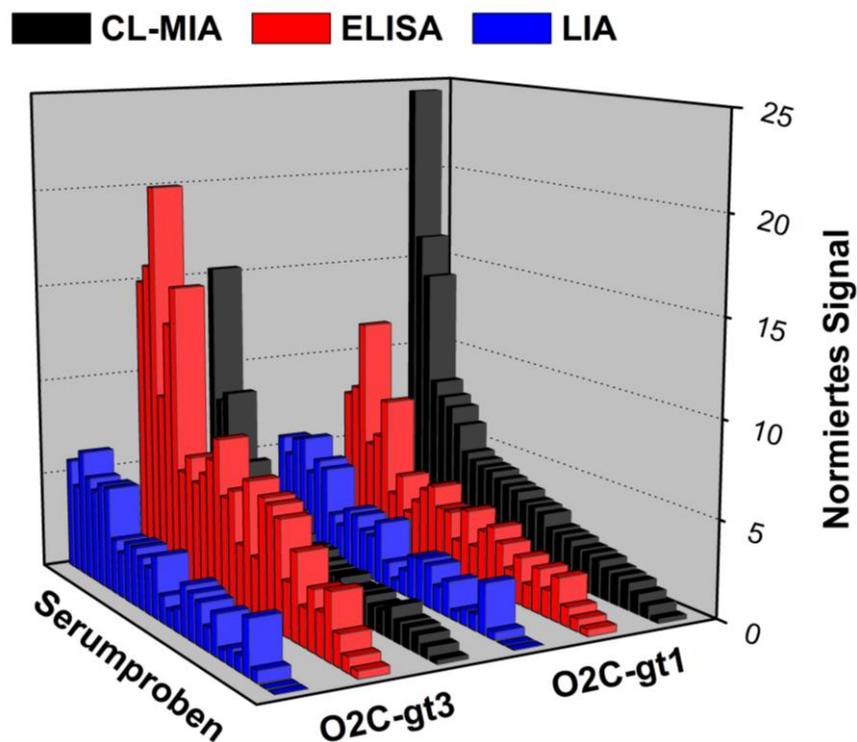


Abbildung 3.32: Zusammenfassung des Serenscreenings für anti-HEV IgG auf Basis von O2C-gt1, gespottet mit der Stammlösung, und O2C-gt3, gespottet nach Pufferaustausch in SDS-freien Spottingpuffer. Die Anordnung der Seren erfolgt mit abnehmenden normierten Signalen der ImmunoChip-Methode für O2C-gt1.

Im Säulendiagramm sind die mit der gleichen Methode ermittelten Signale in gleicher Farbe aufgetragen, wobei die Anordnung der Proben in Bezug auf die normierten Signale der CL-MIA-Messungen mit O2C-gt1 erfolgte. Aus der Graphik können grundsätzliche Aussagen über die dynamischen Bereiche der Immunoassays und die Übereinstimmung der Signale in Abhängigkeit des HEV-Antigens getroffen werden.

Werden die Ergebnisse auf Basis von O2C-gt1 betrachtet, so decken sich die Ergebnisse des Screenings mit den Ergebnissen der Titrationsexperimente. Für den ImmunoChip resultiert die Probenmessung in der größten Signaldifferenz zwischen Proben mit hohem und niedrigem Titer. Seren mit höheren Titern können mittels CL-MIA dabei besser diskriminiert werden als mit dem LIA-Test.

Für die Analytik auf Basis von Antigen O2C-gt3 zeigt sich bei Betrachtung der erreichten normierten Signale, dass auch hier mittels ImmunoChip eine Klassifizierung der Seren möglich ist, aufgrund der Probleme mit der Signalstabilität und der generell geringeren

Absolutsignale für dieses Antigen liegen die normierten Signalwerte jedoch lediglich im Bereich bzw. zum Teil unter denen der anderen Immunoassays. Dies führt bei Vergleich der jeweiligen Methoden unter Bezugnahme auf das verwendete Antigen dazu, dass mit dem Immunochip deutliche Unterschiede in der Reaktivität der Antigene zugunsten von O2C-gt1 festgestellt werden können und die Anordnung der Seren in Abhängigkeit ihrer Reaktivitäten nicht vollständig übereinstimmt.

Wie aus Abbildung 3.32 bei Vergleich der blauen Säulen sichtbar wird, liefert hier der LIA-Test sowohl hinsichtlich der erreichten Signalintensitäten als auch der relativen Reaktivitäten der einzelnen Seren eine sehr hohe Übereinstimmung für beide Antigene. Auch die Auswertung der ELISA-Tests erbringt eine hohe Übereinstimmung in der Klassifizierung der Seren. Hierbei lässt sich eine höhere Reaktivität der Seren mit O2C-gt3 messen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Erwartung überein, da in Schweinen hauptsächlich HEV des Genotyps 3 nachgewiesen wurde und somit das Antigen auf Basis dieses Genotyps der eigentliche spezifische Rezeptor sein sollte. Andererseits bestätigen die Tests mit allen drei Testplattformen die aus anderen Studien bekannte hohe Kreuzreaktivität des Antigens O2C-gt1 mit den gebildeten anti-HEV IgG-Antikörpern. Dieses Ergebnis ist für die Etablierung des Immuno-chips sehr wichtig, da damit ein Antigen-Chip auf Basis von O2C-gt1 für die Analytik von anti-HEV IgG ein geeignetes Verfahren darstellt und nicht auf O2C-gt3 zurückgegriffen werden muss, was aufgrund der mangelnden Stabilität problematisch wäre.

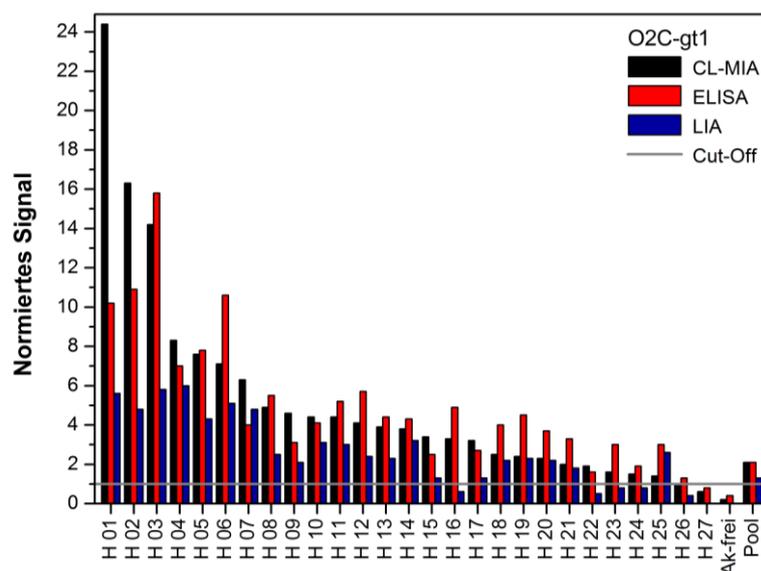


Abbildung 3.33: Vergleichendes Serenscreening für anti-HEV IgG basierend auf O2C-gt1.

Von großer Bedeutung für die Anwendbarkeit des Immunochips als neue Screening-Methode ist der Vergleich der erzielten Befunde auf Basis der Cut-Off-Schwelle. Dazu sind in Abbildung 3.33 die Reaktivitäten der Seren mit Antigen O2C-gt1 mit allen Plattformen dargestellt und das Cut-Off-Level als Entscheidungskriterium eingezeichnet. Auch hier entspricht die Anordnung der Seren den mittels CL-MIA erzielten Signalen. In der detaillierteren Antigen-spezifischen Darstellung ist zu erkennen, dass die normierten Signalwerte für CL-MIA und Mikrotiterplatten-ELISA insgesamt sehr gut übereinstimmen. Im Vergleich dazu treten für den *recomLine*-Test neben grundsätzlich niedrigeren normierten Signalen deutlichere Abweichungen in der Reihenfolge dieser Werte auf, die mitunter sogar zu abweichenden Befunden führen. So werden vier der im LIA als seronegativ beurteilten Seren im CL-MIA für positiv befunden (H 16, H 22, H 23, H 24). Während der Befund für H 16 aufgrund der deutlichen Abweichung vom Ergebnis der beiden anderen Tests vermutlich auf ein fehlerhaftes LIA-Testergebnis hindeutet, werden für die Seren H 22, H 23 und H 24 mit allen Immunoassays niedrige Titer gemessen, wobei im Einklang mit den in Abbildung 3.29 gezeigten Cut-Off-Werten und Kurvenverläufe für ELISA und Immunochip wegen ihrer höheren Nachweisstärke noch eindeutig positive Befunde resultieren. Das Serum H 26 liefert Signale, die bezogen auf die Cut-Off-Grenze für den Immunochip mit einem Wert von 1,0 genau dem Schwellenwert entspricht, während dieses Serum im ELISA über, im LIA dagegen unter dem entsprechenden Cut-Off-Niveau liegt.

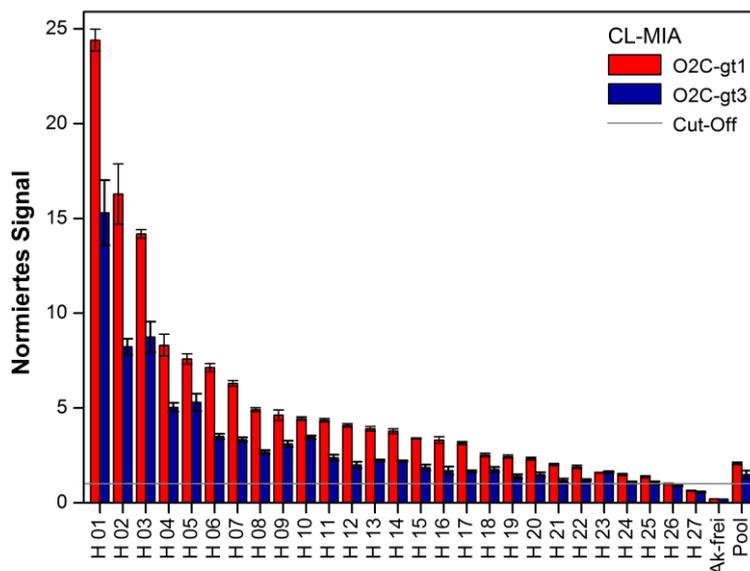
Betrachtet man die positiven Befunde des LIA-Tests, so zeigt sich hier die für die Immunochip-Methode eingeführte Cut-Off-Grenze als offensichtlich geeignet zur Vermeidung falsch-positiver Befunde, da alle im LIA positiven Seren auch mittels CL-MIA als positiv bestätigt werden konnten und bis auf Serum H 25 höhere Signale gemessen werden konnte.

Werden die 27 Realseren in Form einer Prävalenzstudie im Hinblick auf negative und positive Befunden ausgewertet, so ergeben sich die in Tabelle 3.11 zusammengefassten Zahlen. In der Tabelle sind zum Vergleich auch die Ergebnisse mit Antigen O2C-gt3 enthalten.

Tabelle 3.11: Vergleich der Befunde für den Nachweis von anti-HEV IgG in Schweineseren.

| | <i>O2C-gt1</i> | | | <i>O2C-gt3</i> | | |
|-------------|----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|
| | CL-MIA | LIA | ELISA | CL-MIA | LIA | ELISA |
| seropositiv | 26 | 21 | 26 | 25 | 21 | 26 |
| seronegativ | 1 | 6 | 1 | 2 | 6 | 1 |

Die Prävalenzstudie ergibt für die Diagnostik auf Basis von O2C-gt3 eine fast vollständige Übereinstimmung in den Befunden mit den Ergebnissen mittels O2C-gt1. Während die Befunde für ELISA (93 % Positiv-Rate) und LIA (78 % Positiv-Rate) mit beiden Antigenen komplett identisch ausfallen, weicht im Falle des CL-MIAs nur der Befund eines Serums ab. Dies ist Serum H 26, welches wie bereits erwähnt mit O2C-gt1 ein dem Cut-Off-Niveau entsprechendes Signal, mit O2C-gt3 ein Signal geringfügig unter dem Cut-Off-Wert liefert. Hier wirkt sich die aufgrund der Reproduzierbarkeitsprobleme höhere Streuung der Leerwertmessungen für O2C-gt3 in einem etwas höheren Cut-Off-Wert aus, der zu einem abweichenden Befund führt.

**Abbildung 3.34:** Vergleich des Serenscreenings mittels CL-MIA auf Basis von Antigen O2C-gt1 bzw. O2C-gt3. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots (m = 5).

Die insgesamt sehr ähnlichen Resultate zeigen, dass sich beide Antigene generell für die HEV-Analytik eignen, auch wenn die Messungen mit O2C-gt3 geringere Signale mit größeren Schwankungen ergeben (siehe Abbildung 3.34).

Die Messung des kommerziellen Schweineserums führt mit allen Testmethoden zu positiven Befunden. Dieses Ergebnis gibt natürlich keine Information über die generelle Seroprävalenz von anti-HEV IgG wieder, zeigt jedoch, dass in zufällig ausgewähltem Probenmaterial eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, diese Antikörper in Realseren zu finden und dies auch bei Mischung von Blut einer größeren Anzahl an Individuen. Da momentan keine routinemäßige Untersuchung auf Antikörper gegen Zoonosen stattfindet, erfasst auch das Analysenzertifikat des Serums die Existenz dieser Antikörper nicht.

3.3.3.2 Screening von Schweineseren auf anti-*Yersinia* IgG

Für den vergleichenden Nachweis von anti-*Yersinia* IgG in Schweineseren wurde neben dem Immunochip und dem eigenen ELISA-Test ein kommerzieller Antikörper-Test verwendet. Der ELISA-Kit *pigtype Yersinia Ab (1)* (Qiagen) ist zwar nicht Antigen-spezifisch, da aber wie bei den eigenen Testverfahren Yop-Antigene als Rezeptoren eingesetzt werden, ist dieser Test als Referenz dennoch geeignet.

In der Durchführung wurde jedes Serum mit dem Immunochip und dem LIA einfach gemessen, die ELISA-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden insgesamt 21 Schlachthofproben und zusätzlich das kommerziell erhältliche gepoolte Schweineserum auf anti-*Yersinia* IgG untersucht.

Die Ergebnisse dieses vergleichenden Screenings sind in Abbildung 3.35 graphisch dargestellt. Die Normierung der Signale erfolgte auf Basis der in Gleichung 3.1 bzw. 3.2 beschriebenen Cut-Off-Berechnungen, die Anordnung der Seren folgt mit abnehmender Reaktivität im CL-MIA.

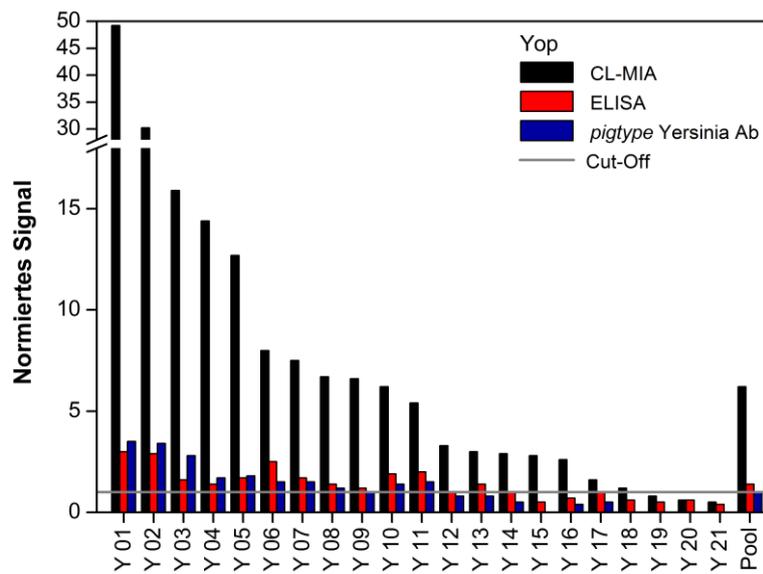


Abbildung 3.35: Vergleichendes Serenscreening für anti-*Yersinia* IgG basierend auf Yop-Antigenen.

Anhand der vergleichenden Darstellung der resultierenden Signale lässt sich für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG die deutliche Überlegenheit der CL-MIA-Methode zeigen. Die in den Titrationsexperimenten festgestellte, weit höhere Sensitivität des Immunochips führt zu einer sehr viel besseren Unterscheidbarkeit der Antikörper-Konzentrationen für die getesteten Seren, die zum größten Teil Titer weit über dem Cut-Off-Schwellenwert für den Chip-Assay aufweisen. Das aus den Verdünnungsexperimenten bestimmte höhere Nachweisvermögen führt darüber hinaus zu Unterschieden in den Befunden für Seren mit niedrigerem Antikörpergehalt. Die Seroprävalenzen, welche mit den drei Methoden erzielt wurden, sind in Tabelle 3.12 wiedergegeben.

Tabelle 3.12: Vergleich der Befunde für den Nachweis von anti-*Yersinia* IgG in Schweineseren.

| | CL-MIA | <i>pigtype</i> Yersinia Ab | ELISA |
|-------------|--------|----------------------------|-------|
| seropositiv | 18 | 10 | 12 |
| seronegativ | 3 | 11 | 9 |

Es ergeben sich für die Prävalenzraten deutliche Abweichungen in Abhängigkeit des verwendeten Immunoassays. Während mittels Immunochip 18 von 21 Seren als positiv bewertet wurden und somit eine Prävalenz von 86 % vorliegt, werden mit den beiden stationären Assays deutliche mehr Proben als seronegativ eingestuft, was zu Prävalenzraten von lediglich 57 % für den selbst entwickelten ELISA bzw. 48 % für den kommerziellen Assay führt. Wird jedoch der Signaltrend der Experimente zum Ansprechverhalten der Yersinien-Assays als Grundlage für die Diskussion dieser auffälligen Abweichungen hinzugezogen (siehe Abbildung 3.31), so sind die einzelnen Prävalenzraten konsistent zu den dort ermittelten analytischen Sensitivitäten und Cut-Off-Schwellen. Da der Immunochip den Referenzmethoden in seinem Nachweisvermögen überlegen ist, weisen einige Proben noch Signale über dem Cut-Off-Wert auf, welche in den untereinander sehr vergleichbaren ELISA-Tests bereits ihre jeweiligen Cut-Off-Grenzen unterschreiten. Gleichzeitig sind im Unterschied zur HEV-Analytik die stationären Tests in ihrem Ansprechverhalten vergleichbar, so dass auch ähnliche Befundraten resultieren. Aufgrund dieser Stringenz der Ergebnisse können umgekehrt alle in beiden ELISA-Tests positiv bewerteten Seren mittels CL-MIA ebenfalls als seropositiv bestätigt werden.

Das gepoolte Serum wird wie bei den HEV-Messungen auch bezüglich anti-*Yersinia* IgG mit allen Methoden als positiv bewertet.

3.3.3.3 Paralleles Screening auf anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG

Zu Abschluss der Prinzipstudie wurden die Seren Y 01 – Y 21 nicht nur bezüglich Yersinien-Antikörper, sondern auch auf HEV-Antikörper untersucht. Diese Messungen entsprechen für anti-*Yersinia* IgG den in 3.3.3.2 gezeigten Messergebnissen. Die hierfür hergestellten rAg-Mikroarray-Oberflächen enthielten neben dem Antigen YopD das HEV-Antigen O2C-gt1, so dass die Seroreaktivitäten für anti-HEV IgG parallel dazu ermittelt werden konnten. Diese Messungen lieferten damit erste Informationen über die Anwendbarkeit des CL-MIA-Assays für Multiplex-Messungen zur Diagnostik verschiedener relevanter Antikörper gegen pathogene Zoonoseerreger. Während die grundsätzliche Eignung des Durchfluss-Assays für einen sensitiven Nachweis der beiden Zielanalyten aus den Titrations- und Screening-Tests bereits bestätigt werden konnte, war über evtl. auftretende Kreuzreaktivitäten noch keine Information vorhanden.

Um Kreuzreaktivitäten nachweisen zu können, ist es normalerweise üblich, die Matrix mit fremden Analyten zu versetzen und die Reaktivität des Rezeptors mit diesen zu überprüfen. Bei quantitativen Immunoassays kann dann in Form einer Kalibrierung und Vergleich der resultierenden Testmittelpunkte die vorliegende Kreuzreaktivität abgeschätzt werden. Der Mikroarray als Immunoassay-Plattform bietet im Unterschied zum klassischen Mikrotiterplatten-Assay den großen Vorteil, dass für den qualitativen Nachweis einer Kreuzreaktivität nicht unbedingt eine Kalibrierung durchgeführt werden muss. Werden auf dem Chip die verschiedenen spezifischen Rezeptoren immobilisiert, so führt die Kreuzreaktivität eines Analyten automatisch zu Signalen auf den Spotflächen des „falschen“ Rezeptors. Übertragen auf die Antikörperdiagnostik müssten bei Kreuzreaktivität des YopD-Antigens also Signale mit Proben, die anti-HEV IgG enthalten, auf den YopD-Spots gemessen werden bzw. umgekehrt. Allerdings kann mit den Realseren diese Aussage nur dann getroffen werden, wenn Seren existieren, welche nur einen der beiden IgG-Antikörper enthalten. Werden also Seren gefunden, die nur mit einem der beiden Antigene Signale zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass die Antigene mit sehr hoher Selektivität nur ihren Zielantikörper erkennen.

Die Ergebnisse des parallelen Screenings sind in Abbildung 3.36 dargestellt.

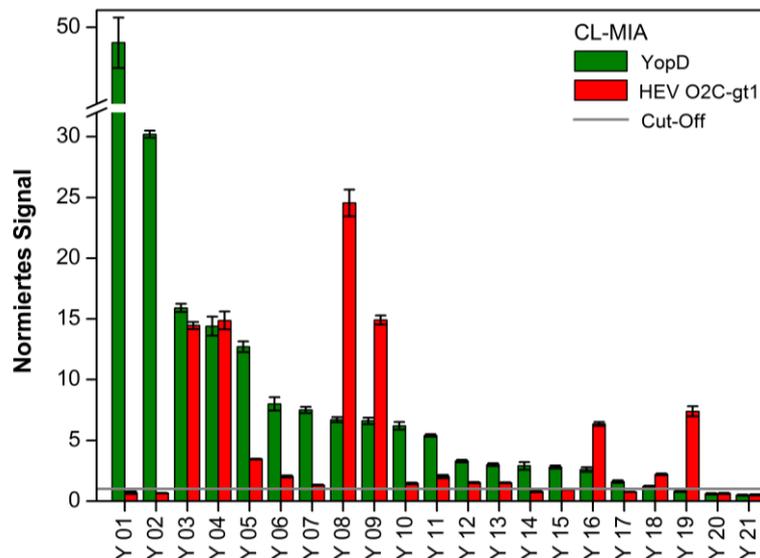


Abbildung 3.36: Parallele Detektion von anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG mittels CL-MIA auf Basis der rekombinanten Antigene HEV O2C-gt1 und YopD. Die Fehlerbalken repräsentieren die Intra-Assay-Varianz der Replikat-Spots ($m = 5$).

Wie aufgrund der bekannt hohen Seroprävalenz von anti-HEV IgG zu erwarten ist, werden mit den meisten Seren der Y-Charge nicht nur Signale für anti-*Yersinia* IgG erhalten, sondern es sind ebenfalls Signale für anti-HEV IgG messbar. Dabei werden für zwölf der 21 Seren Signale gemessen, die für beide Zielantikörper über den jeweiligen Cut-Off-Werten liegen. Von den restlichen neun Seren zeigen sieben Proben für einen der beiden Antikörper Signale über der Entscheidungsgrenze, die Seren Y 20 und Y 21 werden für beide Antikörper als seronegativ bewertet.

In Abbildung 3.37 sind exemplarische Messbilder für die unterschiedlichen Befunde abgebildet. Während sich ein positiver Befund für beide Antikörper wie für Serum Y 03 theoretisch aus einer hohen Kreuzreaktivität eines Antigens mit beiden Antikörpertypen ergeben kann, sind die Seren Y 02 und Y 19 dagegen Beispiele, die bestätigen, dass beide Antigene mit hoher Selektivität nur ihren jeweiligen Zielanalyten binden. Damit lässt sich eine für die Beurteilung der Seren relevante Kreuzreaktivität der Antigene mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

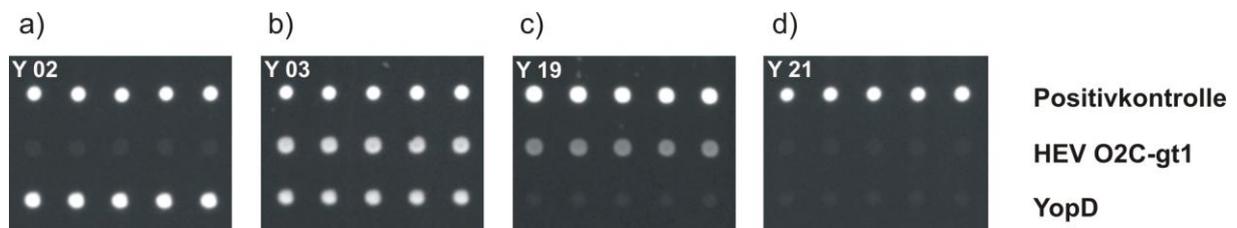


Abbildung 3.37: 2D-Bilder der CCD-Kamera für Immunochip-Messungen mit a) Serum Y 02, b) Serum Y 03, c) Serum Y 19 und d) Serum Y 21.

Aus der Häufung von doppelt positiven Befunden kann möglicherweise indirekt auf den Hygienestatus des Mastbetriebes geschlossen werden. Da zu solchen Korrelationen aufgrund der bisher hauptsächlich Erreger-spezifischen Seroprävalenzstudien noch keine Daten vorliegen, begründet sich hier das Potenzial des Mikroarray-Verfahrens. Mit Hilfe des Immunochips könnten in Zukunft mit einer Messung umfassende Informationen über den Hygienestatus eines Individuums bzw. eines Betriebes gewonnen werden, um z.B. allgemeine Hygienemängel von sporadisch auftretenden Infektionen mit einem bestimmten Erreger abzugrenzen.

Fazit

Die Bewertung des Serenscreenings auf Basis des rAg-Immunchips fällt insgesamt sehr positiv aus. Es konnte für beide Zielantikörper gezeigt werden, dass die neu etablierte Mikroarray-Methode und die eingeführte Cut-Off-Definition keine falsch-positiven Befunde im Vergleich zu den Referenzmethoden *recomLine* HEV IgG/IgM (Mikrogen) bzw. *pigtype* Yersinia Ab (Qiagen) liefert. Vielmehr konnte festgestellt werden, dass der sensitivere CL-MIA für einige Seren, welche mit den Vergleichsmethoden einen seronegativen Befund ergaben, Signale deutlich über dem Cut-Off-Wert lieferte. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Titrationsexperimente und unterstreicht das Potenzial der neuen Immunoassay-Methode als nachweisstarke und sensitive Alternative zu den bestehenden kommerziellen Tests, verbunden mit dem großen Vorteil eines äußerst zeitnahen Befundes.

Darüber hinaus konnten Seren erfolgreich simultan auf beide Antikörper getestet werden und somit die grundsätzliche Eignung des Immunchips für die Multiplex-Analyse von Schweineseren auf relevante Zoonose-Antikörper bestätigt werden, was die Attraktivität der neuen Methode stark erhöht.

Für eine Absicherung der Aussagen über die Leistungsfähigkeit und Reproduzierbarkeit des rAg-Immunchips muss in weiteren Arbeitsschritten eine deutlich größere Zahl an Realseren analysiert werden und dabei insbesondere die Gültigkeit der Cut-Off-Grenzen überprüft werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Infektionskrankheiten mit zoonotischem Hintergrund stellen ein großes Risikopotenzial für die öffentliche Gesundheit dar. Es besteht daher nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der veterinärmedizinischen Diagnostik ein großer Bedarf an schnellen und automatisierbaren Nachweismethoden zur Seroprävalenz-Bestimmung von Pathogenen mit zoonotischem Potenzial bei Schlachtvieh wie z.B. Mastschweinen, um eine gute Lebensmittelhygiene sicherzustellen und den Verbraucherschutz zu verbessern.

Wenn Tiere mit Pathogenen infiziert werden, so produzieren sie Antikörper gegen die Erreger. Mit Hilfe einer Serumanalyse kann folglich bei Schlachtschweinen auf den Infektionsstatus des Individuums rückgeschlossen werden. Bei Schweinen bzw. Schweinefleisch sind hier Pathogene wie *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Trichinella* spp., *Toxoplasma* spp. und das Hepatitis E-Virus (HEV) von Interesse.

Momentan besteht jedoch ein Mangel an Multiplex-fähigen und schnellen Nachweismethoden, um umfassende Informationen über eine größere Zahl an Antikörpern gegen Zoonoseerreger zu gewinnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine diese Anforderungen erfüllende Nachweismethode für Antikörper gegen zoonotische Pathogene zu entwickeln, welche zukünftig einen Beitrag für die Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit durch die fleischverarbeitende Industrie leisten kann. Die Detektion sollte dabei mittels eines Mikroarray-Immunoassays basierend auf rekombinanten Antigenen (rAgs) erfolgen, welcher an der Chemilumineszenz-Durchfluss-Mikroarray-Immunoassay (CL-MIA)-Ausleseplattform MCR 3 (*Munich Chip Reader 3rd generation*) durchgeführt werden kann.

Zunächst musste eine Strategie für die Immobilisierung der rekombinanten Antigene entwickelt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Aktivierungsmöglichkeiten von Diamino-PEG-beschichteten Glaträgern getestet. Zum einen wurde die Aktivierung mittels Einführung reaktiver Epoxy-Gruppen untersucht (Epoxy-PEG), zum anderen die Aktivierung mittels NHS-Ester (NHS-Amid-PEG). Um diese kovalenten Kopplungstechniken mit einer adsorptiven Immobilisierung zu vergleichen, wurden Nunc Polystyrol (PS)-Objektträger mitgetestet. Die Immobilisierungsausbeuten der drei Oberflächenvarianten wurden mit der MOPS-SDS-Stammlösung eines HEV-rAgs auf Basis der ORF2 (*open reading frame 2*)-Region des Genotyps 1 (O2C-gt1) untersucht. Der Vergleich erbrachte, dass sowohl für das Antigen als auch den Kontrollantikörper bessere Signale auf den Glasoberflächen erzielt werden konnten als mit den PS-Oberflächen. Damit konnte gezeigt werden, dass die

kovalente Immobilisierungsstrategie über die terminalen Amine der rekombinanten Antigene zu bevorzugen ist. Bei vergleichbaren Hintergrund-Signalen konnten dabei für die Epoxy-PEG-Chips die höchsten CL-Signale für Kontrollantikörper und HEV O2C-gt1 gemessen werden. Zudem wurden mit dieser Oberflächenvariante die geringsten Standardabweichungen ermittelt. Deshalb wurde für die weiteren Studien die Epoxy-PEG-Oberfläche gewählt. Die Belegung der Chipoberfläche mit BSA (bovines Serumalbumin) erwies sich als Schlüsselschritt für die Gewährleistung der Aktivität der verwendeten rAgs und garantierte somit ein analytisch verwertbares Signal-zu-Rauschen-Verhältnis.

Um die Wiederholbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Mikroarray-Herstellung und des Durchfluss-Assays zu untersuchen, wurden mehrere Mikroarray-Chips analysiert. An drei Messtagen wurden die CL-Signale der HEV rAgs hinsichtlich der Spotqualität (Intra-Assay-Varianz) und der Chip-zu-Chip-Varianz (Inter-Assay-Varianz) ausgewertet. Dabei konnten niedrige Intra-Assay-Varianzen im Bereich von 5 % ermittelt werden, was auf eine hohe Homogenität der Epoxy-PEG-Oberfläche und die Eignung des Spottingpuffers schließen lässt. Im Fall des Antigens O2C-gt1 erwies sich die 1:2-Verdünnung der Stammlösung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit als vorteilhaft und ohne Auswirkungen auf die Signalintensität. Unter diesen Bedingungen bestätigten die statistischen Parameter in Form von niedrigen Inter-Assay-Varianzen die Reproduzierbarkeit der Chip-Herstellung und der Immunoassay-Durchführung. Unter Berücksichtigung des Durchfluss-Prinzips unterstreicht die über alle Messtage gemittelte Inter-Assay-Varianz von lediglich 6,6 % (n = 33) die Eignung der neu entwickelten rAg-basierten Nachweismethode. Der eingeführte Erwartungsbereich kann dabei zukünftig als Hilfsmittel für die Charakterisierung der Assay-Qualität und zur Klassifizierung von Realseren zu Screening-Zwecken herangezogen werden.

Zur Etablierung von *Cut-Off*-Niveaus für die Immunochip-Methode wurden Blindproben-Messungen durchgeführt, um die Schwankungen des Signalhintergrunds zu bestimmen. Für den Nachweis von anti-HEV IgG wurden dabei die Antigen O2C-gt1 und O2C-gt3 eingesetzt, zur Detektion von anti-*Yersinia* IgG diente das rAg YopD (*Yersinia outer protein D*).

Dabei konnte in Übereinstimmung mit den vorherigen Messungen mit positiven Proben eine hohe Reproduzierbarkeit für Messungen mit HEV O2C-gt1 festgestellt werden, die sich in Varianzen von 3,9 % (n = 15), 5,5 % (n = 6) und 4,9 % (n = 5) der einzelnen Messtage ausdrückt. Insgesamt ergab sich eine Varianz von 4,5 % (n = 26). Für HEV O2C-gt3 zeigte sich ebenfalls eine hohe Wiederholbarkeit der Messungen an einzelnen Messtagen (4,3 %, 4,3 %, 4,3 %).

4,5 % und 5,7 %), bei Betrachtung der Ergebnisse über alle Messtage hinweg ergab sich eine etwas höhere Abweichung von 7,8 %. Die Auswertung der Blindproben-Messungen für YopD erbrachte Varianzen von 13,3 % (n = 6), 8,5 % (n = 6) bzw. 6,1 % (n = 8), was einer Gesamtstreuung von 9,7 % (n = 20) entspricht. Dieses Ergebnis bietet eine geeignete Grundlage für ein Serenscreening auf anti-*Yersinia* IgG.

Auf Basis dieser Blindproben-Messungen wurden analytische Cut-Off-Werte berechnet. Dabei wurde das Cut-Off-Niveau jeweils einem Antikörper-Titer zugeordnet, welcher der Signalintensität des Mittelwertes der Blindproben-Messungen zuzüglich dessen 10-facher Standardabweichung entspricht. Mit dieser Definition sollen falsch-positive Befunde nach Möglichkeit vermieden werden.

Um das Potenzial der Immunochip-Methode einschätzen zu können, waren vergleichende Methoden zur Beurteilung des Ansprechverhaltens und von Probenbefunden nötig. Hierfür wurde der Line-Immunoassay (LIA) *recomLine* HEV IgG/IgM (Mikrogen), welcher für humanes Probenmaterial kommerziell eingesetzt wird, sowie das kommerzielle ELISA-Kit *pigtype* *Yersinia* Ab (Qiagen) herangezogen. Der LIA wurde dabei durch Verwendung eines anti-Schwein-IgG-HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugats für Serumproben von Schweinen adaptiert. Zusätzlich wurden selbst entwickelte *In-house* ELISAs zur Bewertung herangezogen.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs von CL-MIA, ELISA-Tests und LIA in Form einer Serumtitration zeigten, dass der Immunochip mit seiner Auslesung am MCR 3 die mit Abstand beste Sensitivität und den größten dynamischen Bereich besitzt. Mit dem Immunochip ist somit eine deutlich genauere Klassifizierung von Proben bezüglich ihres Antikörpergehaltes möglich.

Sowohl mit dem entwickelten *In-house* ELISA als auch mit dem Immunochip konnte den Cut-Off-Grenzen für anti-HEV IgG eine vierfach höhere Probenverdünnung zugeordnet werden als dies für den LIA als Referenz möglich. Bei Vergleich der Titrationskurve für anti-*Yersinia* IgG konnte mittels CL-MIA sogar mit einer zehnfach höher verdünnten Probenlösung noch Signale überhalb des Cut-Off-Niveaus detektiert werden als dies für die Mikrotiterplatten-Assays möglich war. Somit erlaubt der Mikroarray-basierte Assay am MCR 3 eine effektive semiquantitative Analyse auf anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG mit besserem Nachweisvermögen als die Vergleichsplattformen innerhalb von weniger als neun Minuten.

Für eine vollständige Charakterisierung der rAg-Immuno-chips wurden auch Realproben analysiert und die Befunde bezüglich der Existenz von HEV- bzw. Yersinien-Antikörpern verglichen. Dazu wurden 27 Serumproben (H 01 – H 27) mittels Immuno-chip, In-house ELISA und *recomLine* HEV basierend auf O2C-gt1 und O2C-gt3 getestet. 21 Schweineseren (Y 01 – Y 21) wurden mittels Immuno-chip, In-house ELISA und *pigtype* Yersinia Ab auf Basis des rekombinanten Antigens YopD untersucht.

Im Fall der HEV-Diagnostik konnten generell ähnliche Befunde mit beiden Antigenen erzielt werden, wobei einer geringere Reaktivität von O2C-gt3 im CL-MIA festgestellt werden konnte. Während mittels LIA-Test 78 % der Seren als positiv bezüglich anti-HEV IgG eingestuft werden konnten, ergaben sich für den In-house ELISA und den Immuno-chip positive Befundraten von 93 % bzw. 96 % für den Nachweis basierend auf O2C-gt1 und O2C-gt3. Für die höheren Befundraten gegenüber dem LIA bietet das in den Titrationsversuchen ermittelte bessere Nachweisvermögen eine plausible Erklärung. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass die im LIA positiv bewerteten Proben ohne Ausnahmen über dem Cut-Off-Signal der Immuno-chip-Methode lagen.

Das Screening auf Yersinien-Antikörper bestätigte das Potenzial des Immuno-chips als sensitive und nachweisstarke Nachweismethode. Es wurden 86 % der Schweineseren positiv getestet, während mit den stationären ELISA-Assays nur 57 % bzw. 48 % der Proben positiv beurteilt werden konnten. Auch hier liegt die Ursache für diesen deutlichen Unterschied in der Nachweisstärke des Durchfluss-Assays.

Abschließend wurde die Multiplex-Fähigkeit der neuen Immuno-chip-Methode getestet. Hierfür wurden Mikroarray-Chips sowohl mit HEV O2C-gt1 als auch YopD belegt. Mit diesen Chips wurden die Schweineseren Y 01 – Y 21 parallel auf anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Unterscheidung der beiden Zielantikörper ohne messbare Kreuzreaktivitäten möglich ist. Somit konnte durch diese erste Prinzipstudie des Multiplex-Ansatzes das große Potenzial des neu entwickelten rAg-basierten Immuno-chips für die Anwendung als schnelle und automatisierbare Screening-Methode für ein breites Spektrum an Serumantikörpern aufgezeigt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Schweineseren mittels einer schnellen und automatisierten Messmethode am MCR 3 unter Verwendung von rAg-Mikroarrays parallel auf anti-HEV IgG und anti-*Yersinia* IgG untersucht werden können. Aufgrund der hohen Übereinstimmung in den Befunden des Immuno-chips mit den

Ergebnissen des für Schweineseren adaptierten LIA-Tests und der In-house ELISAs für beide HEV-Antigene und der bekannten Kreuzreaktivität mit dem Genotyp 3, kann gerade der Nachweis basierend auf HEV O2C-gt1 als geeignete Methode zur Bestimmung von anti-HEV IgG beurteilt werden. Die Messungen mit YopD bestätigen die Eignung der neuen Methode für Screening-Zwecke, nachdem der Immunochip seine höhere Sensitivität und Nachweisstärke auch bezüglich anti-*Yersinia* IgG bei Vergleich mit stationären Assays unter Beweis stellen konnte.

Um das für eine gesamtheitliche Überwachung des Hygienestatus von Schlachtschweinen erforderliche Screening zu ermöglichen, besteht der nächste Schritt darin, weitere Antigene auf den Chip zu übertragen. Gerade Antigene zum Nachweis von Antikörpern gegen *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Toxoplasma gondii* wären hier von großem Interesse für die Zoonosen-Prävention.

Ist die Basis für solch einen Multiplex-Mikroarray-Chip geschaffen, ist eine weitere Zielstellung, ein effektives Protokoll zur Regenerierung der Chipoberfläche zu entwickeln. Die Möglichkeit einer Mehrfachverwendung des Chips würde die Attraktivität der Methode stark erhöhen, da dann die Kosten pro Analyse deutlich reduziert und somit die Wettbewerbsfähigkeit gegenüber den bisher kommerziell erhältlichen Diagnose-Kits noch gesteigert werden könnte.

In zukünftigen Studien sollte darüber hinaus mit einem größeren Seren-Panel insbesondere mit Proben, die geringere Antikörper-Titer aufweisen, die Eignung der in dieser Arbeit eingeführten Definition des Cut-Off-Niveaus überprüft werden.

5 Summary and Outlook

Infectious diseases evoked by zoonotic pathogens present an enormous risk for public health. Thus, in both veterinary and human medicine fast and automated detection methods for the analysis of seroprevalence of zoonotic pathogens in slaughter animals, such as fattening pigs, are of paramount importance in order to monitor and ensure good food hygiene as well as for improving public health. Infected animals produce antibodies against these pathogens and consequently, by analyzing the blood sera of i.e. slaughtered pigs, the infectious status of the animal can be determined. In the particular case of porcine meat, the pathogens *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Trichinella* spp., *Toxoplasma* spp., and Hepatitis E Virus (HEV) are of great interest. Yet there is currently a lack of multiplexed and fast methods to gain information about a broad variety of antibodies against zoonotic pathogens.

To this end, aim of this work was to establish an automated and multiplexed method for detection of antibodies against zoonotic pathogens, which would aid the meat-producing industries with respect to improving both food safety and public health. The detection method should be based on recombinant antigen (rAg)-microarray-immunoassays (MIA), which could be analyzed using a flow-through readout system with chemiluminescence (CL) detection (Munich Chip Reader 3rd generation, MCR 3).

First, a protocol for immobilization of recombinant antigens (rAgs) had to be developed. Therefore, two different activation methods of diamino-PEG-coated glass slides were investigated: activation with introduction of reactive terminal epoxy groups (epoxy-PEG surface) and activation via NHS ester (NHS-amid-PEG surface). In order to compare these two types of covalent attachment with immobilization based on adsorption, Nunc polystyrene (PS) microscope slides were examined as substrate. The immobilization efficacies of the three surface modifications were evaluated with a rAg based on *open reading frame 2* (ORF2) of HEV genotype 1 (HEV O2C-gt1) in a MOPS-SDS buffer. Comparing covalent and adsorptive binding of antigen and antibody to the surface, the functionalized glass slides revealed significantly higher signals than the PS surface. This demonstrated that the covalent coupling of terminal amino groups to the activated chip surface is the preferred immobilization strategy for rAgs. Epoxy-PEG-activation showed the highest CL signals and lowest signal variations for positive control and O2C-gt1 antigen, while presenting similar background signals for the negative control spots. Hence, epoxy-PEG microarray chips were selected for further studies. Blocking the chip surface with BSA (bovine serum albumin) was shown to be crucial in order to maintain rAg activity and consequently to achieve high signal-to-noise ratios.

Repeatability and reproducibility of the microarray production and the flow-through assay performance were tested by analyzing several microarray chips. The CL signals of HEV rAgs were evaluated on three measurement days regarding spot quality (intra-assay variation) and chip-to-chip variation (inter-assay variation). Low intra-assay coefficients of variation (CV) in the range of 5 % could be determined for all microarray measurements, which indicate high homogeneity of the epoxy-PEG surface and suitability of the spotting buffer composition. For O2C-gt1, 1:2 dilution of the antigen stock solution improves the signal reproducibility, while maintaining comparable signal values. The statistical parameters for HEV antigen O2C-gt1 showed high reproducibility of the chip preparation and CL-MIA performance. Taking the flow-through principle in consideration, low overall inter-assay CV of 6.6 % (n = 33) confirms the feasibility of this new rAg-based detection method. The introduced interval of prediction is an appropriate tool for characterization of the assay quality and can be used to classify serum samples for screening purposes.

In order to establish a cut-off level for the immunochip method, repeated measurements of blank samples were conducted. For detection of anti-HEV IgG, rAgs based both on genotype 1 and 3 were used, whereas *Yersinia outer protein D* (YopD) was applied to detect anti-*Yersinia* IgG.

In accordance with the results of the assay characterization, high reproducibility of the blank measurements for HEV O2C-gt1 could be demonstrated by intra-day CVs of 3.9 % (n = 15), 5.5 % (n = 6), and 4.9 % (n = 5) and an overall inter-day CV of 4.5 % (n = 26). For HEV O2C-gt3, the CV values of the single days also showed high repeatability (4.3 %, 4.5 %, and 5.7 %). Slightly bigger deviations of the single days mean values were obtained, which is expressed by an overall CV of 7.8 %. Evaluation of the inter-assay variations of blank measurements based on YopD lead to intra-day CVs of 13.3 % (n = 6), 8.5 % (n = 6), and 6.1 % (n = 8), resulting in an overall inter-day CV of 9.7 % (n = 20). This provides a sufficient assay quality for serum screening purposes regarding anti-*Yersinia* IgG.

For assessment of serum samples, based on these blank measurements an analytical cut-off was calculated. This cut-off was set to be at the signal level of the mean blank signal added by 10-fold standard deviation to ensure avoidance of false-positive findings regarding specific antibody presence in the sample. Using this cut-off definition, dose-response measurements were evaluated in comparison.

The performance of the new immunochip method was examined using the line immunoassay (LIA) *recomLine* HEV IgG/IgM (Mikrogen), which is commercially available for human diagnostics, and the ELISA test kit *pigtype* *Yersinia* Ab (Qiagen) in order to compare dose-response and screening results. Using anti-swine IgG-HRP (horseradish peroxidase) conjugate the LIA test was adapted for analysis of swine serum samples. Furthermore, in-house ELISA tests were developed for detection of both anti-HEV IgG and anti-*Yersinia* IgG.

The results of the comparison highlighted the high sensitivity and large dynamic range of the immunochip developed on the analysis platform MCR 3 in comparison to the LIA and ELISA tests, allowing for a more precise discrimination of serum samples in regard to their specific IgG antibody level. Considering the cut-off levels, a 4-fold higher dilution could be evaluated with in-house ELISA and immunochip for anti-HEV IgG. Comparing the dose-response curves for detection of anti-*Yersinia* IgG, the immunochip method even allowed for identification of antibodies at a 10-fold higher dilution factor than the microtiter plate-based assays. Thus, an effective differentiation of anti-HEV or anti-*Yersinia* IgG (positive and negative) swine serum samples on the analysis platform MCR 3 was achieved within less than 9 minutes.

For a more complete characterization of the rAg immunochip, real serum samples were screened and assessed regarding HEV and *Yersinia* IgG antibodies. Therefore, 27 serum samples were tested with immunochip, in-house ELISA, and porcine *recomLine* HEV based on HEV O2C-gt1 and O2C-gt3, and 21 samples with immunochip and in-house ELISA based on recombinant antigen YopD, and additionally *pigtype* *Yersinia* Ab ELISA test.

All samples tested positive for anti-HEV IgG in the LIA could be confirmed to be positive with immunochip and ELISA measurements. Further, similar signal trends could be found for both HEV antigens, although lower reactivity of the O2C-gt3 antigen was visible. 78 % swine sera were tested positively using the line immunoassay. Using the HEV rAgs O2C-gt1 and O2C-gt3, the immunochip and the in-house ELISA identified HEV antibodies in 93 % and 96 % of the tested swine sera, respectively. The lower limit of detection determined for the immunochip method presents a plausible explanation for this finding. The evaluation of the sample screening regarding anti-*Yersinia* IgG confirmed the potential of the immunochip for sensitive antibody screening purposes. For the immunochip assay, 86 % of the swine serum samples were tested positively, whereas using in-house ELISA 57 % and using *pigtype* *Yersinia* Ab 48 % of the samples resulted in positive findings. This obvious difference in the

obtained seroprevalence can be explained by the higher detection capability of the immuno chip method.

For final evaluation of the new immuno chip, the applicability of the method towards multiplexed screening of swine serum samples was investigated. Therefore, microarray chips were prepared on which the rAgs HEV O2C-gt1 and YopD were both immobilized. With these chips, serum samples were screened simultaneously for anti-HEV and anti-*Yersinia* IgG. It could be shown, that differentiation between the target antibodies is possible without cross-reactivities. This successful proof-of-concept of the multiplex approach demonstrates the potential of the newly developed rAg-based immuno chip for application as a rapid, automated and specific screening method of a broad variety of antibodies against zoonotic pathogens in swine serum samples.

To summarize, in this work it has been shown that swine sera can be screened rapidly, automatically and in parallel for anti-HEV and anti-*Yersinia* IgG using rAg-based immuno chips on the analysis platform MCR 3. Based on the total agreement of the results with the complementary performed porcine HEV LIA and the in-house ELISA test for both HEV antigens and due to known high cross-reactivity of O2C-gt1, the immuno chip design using O2C-gt1 is suitable for detection of HEV IgG antibodies in swine serum matrix. The immuno chip measurements for determination of anti-*Yersinia* IgG using YopD further confirm the potential of the new method featuring a higher detection capability than the in-house ELISA and the commercially available ELISA kit *pigtype* *Yersinia* Ab (Qiagen).

As a next step in order to establish a fast and holistic screening method for sera of slaughtering pigs, the integration of more antigens on the immuno chip is planned. Hereby, in particular the detection of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Toxoplasma* spp. antibodies would be of great interest. Based on a multiplexed microarray, the development of an effective regeneration protocol of the chip surface constitutes an additional important step to gain attractiveness of the method, as a multi-usable microarray chip would decrease the costs per analysis significantly and hence feature its competitiveness with respect to the commercially available diagnostic kits. For detailed investigation regarding the feasibility of the introduced cut-off definition for sample assessment, more samples with low antibody content need to be analyzed.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Geräte und Materialien

Autoklav (Laboklav, SHP Steriltechnik, Magdeburg)

Bohr- und Fräsgerät MICROMOT 50/E mit NG 2/S (Proxxon, Niersbach)

Direktverdrängerpipette 100 - 1000 µL Microman (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)

ELISA-Kit *pigtype* Yersinia Ab (1) (273801, Qiagen, Hilden)

ELISA-Kit PrioCheck® HEV porcine (4600010, Prionics, Schlieren-Zürich)

Färbereinsatz, PP, für 20 Objektträger (2291.1, Roth, Karlsruhe)

Färbeschale, TPX (2290.1, Roth, Karlsruhe)

Klebefolie ARcare 90106, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research Ireland., Limerick)

Klebevorrichtung zur Fertigung der Durchflusszellen (IWC, München)

Klimakammer HCP 108L (Mettler, Büchenbach)

Kontaktspotter-Nadel Stealth Solid Pin SNS 9 (Arraylt®, Sunnyvale, CA, USA)

Kontaktspotter-System, BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer (Bio-Rad Laboratories, München)

Kunststoffträger, PMMA, schwarz (Sahlberg, Feldkirchen; gefräst am IWC, München)

LIA-Kit *recomLine* HEV IgG/IgM (5072, Mikrogen GmbH, Neuried)

Magnetrührer mit Heizung IKAMAG RCT (IKA Labortechnik, Staufen)

MCR 3 (gwk Präzisionstechnik GmbH, München)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, PS, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 384 Kavitäten, PP, konisch, (784201, 655061, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

MTP-Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

MTP-Spülgerät ELx405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

Multikanal-Transferpipette 20 - 200 µL (Brand, Wertheim)

NanoPhotometer® (Implen GmbH, München)

Objektträger, geschnitten, 26 x 76 x 1 mm, ± 0,1 mm (BA 11.1, Roth, Karlsruhe)

Objektträger Nunc PS 25 x 75 mm (160004, Glasatelier Saillart, Meerhout, Belgien)

Petrischalen, Glas (0690.1, Roth, Karlsruhe)

PTFE-Schläuche Bola, ID 0,5 mm / 1,0 mm, AD 1,6 mm (S 1810-09, S 1810-12, Bohlender, Grünsfeld)

Pipetten 0,5 - 10 µL, 10 - 100 µL, 100 - 1.000 µL, 1-5 mL (Abimed, Langenfeld)

pH-/mV-/Temperatur-Messgerät *SevenGo*TM SG2 (Mettler-Toledo, Gießen)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Schüttelinkubator (C24KC, Edison, NJ, USA)

Schüttler für Mikrotiterplatten Easyshaker EAS 2/4 (SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim)

Schüttler für Mikrotiterplatten und Objektträgerschalen Titramax 100 (Heidolph, Schwabach)

Stanzzuschnitt Klebefolien, 2-Kanalstruktur (Marbach Stanzformtechnik, Heilbronn)

Trockenschrank, max. 120°C (Memmert, Büchenbach)

Ultrazentrifugationseinheiten Amicon Ultra 0.5ML 10 K (UFC501096, Millipore, Schwalbach)

Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin)

Verschlussklammern für Dialyse (2779.1, Roth, Karlsruhe)

Versanddosen, PP, für 5 Objektträger (T208.1, Roth, Karlsruhe)

Vortexer TOP MIX Fisherbrand 15024 (11118, Novodirect, Kehl)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen)

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolien für Mikrotiterplatten Rotilabo® (EN76.1, Roth, Karlsruhe)

Dialysemembran, Ø 6,4 mm, MWCO 6.000-8.000 (1954.1, Roth, Karlsruhe)

Direktverdrängerspitzen, 100 - 1.000 µL, steril (17008609, Mettler-Toledo, Gießen)

Einmalkanülen, 120 mm x 0,80 mm, 40 mm x 0,90 mm, steril (C630.1, C721.1, Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze Injekt, 20 mL, steril (0059.1, Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze Injekt-F, 1 mL, steril (T987.1, Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze Omnifix-F, 1 mL, steril (H999.1, Roth, Karlsruhe)

Handschuhe, Nitril, (P778.1, Roth, Karlsruhe)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, PP, Flachboden (655201, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, PS, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner-Bio One, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 384 Kavitäten, PP, *small volume* (784201, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Parafilm (H666.1, Roth, Karlsruhe)

Pasteurpipetten (4522, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard MAKRO 1 - 5 mL, unsteril (5846.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard MIKRO 0,1 - 10 µL, unsteril (K138.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL 1 - 200 µL, unsteril (2395.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL 100 - 1.000 µL, unsteril (2679.1, Roth, Karlsruhe)

Probenfläschchen Rotilabo®, 4 mL (E152.1, Roth, Karlsruhe)

Reaktionsgefäße Multi®-Ultra Tubes 0,2 mL (H560.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläschen Rotilabo® 5, 10, 20, 25 mL (X654.1, X655.1, X657.1, X659.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenfildereinheiten Amicon® Ultra, 0,5 mL, MWCO 10.000 (UFC501096, Millipore, Schwalbach)

Zentrifugenröhrchen Rotilabo® Eco 15, 50 mL, steril (AN77.1, AN79.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen Rotilabo® Eco 15, 50 mL, unsteril (AN76.1, AN78.1, Roth, Karlsruhe)

6.1.3 Software

Avis FITS Viewer (MSB di F. Cavicchio, Ravenna, Italien)

BioOdyssey Calligrapher 2.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

ChemBioOffice 2008 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA)

Corel Graphics Suite 12 (Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada)

Gen5 Microplate Data Collection + Analysis Software (BioTek, Vermont, USA)

ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA)

LabVIEW 8.2 (National Instruments, Austin, TX, USA)

MCRVisualization (ODEVIS AG, Burghausen)

Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Origin 7G (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA)

SCL-Auswertesoftware Visual C++-Bildanalyse 1.0.2 (W. Wolter, TU München)

6.1.4 Chemikalien und Reagenzien

6.1.4.1 Chemikalien

Bovines Serumalbumin (A3059, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Calciumchlorid (C1016, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Casein aus Kuhmilch, purified powder (C5890, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Dikaliumhydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4-Dimethylaminopyridin (29224, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

N,N'-Dimethylformamid (40248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Di(N-succinimidyl)carbonat (43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

1,4-Dithiothreitol (6908.3, Roth, Karlsruhe)

Ethanol (32205, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (440167, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Glycin (33226, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Hellmanex® II (320002, Hellma, Müllheim)

Kaliumdihydrogencitrat (60214, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Kaliumdihydrogenphosphat (P5655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Kaliumsorbit (85520, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (6979, Roth, Karlsruhe)

Natriumazid (S2002, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumcarbonat (71351, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumchlorid (71381, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumhydrogencarbonat (71351, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumhydroxid (S5881, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumdihydrogenphosphat (71496, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Pluronic F127, Zellkultur getestet (P2443, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Polyethylenglycoldiamin, 2.000 Da (Jeffamine D 2000, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)

Polyethylenglycoldiglycidylether, 526 Da (475696, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Salzsäure, 37 % (v/v) (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Schwefelsäure, 95-97 % (v/v) (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sodiumdodecylsulfat (L6026, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (87748, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Trehalose-D(+) Dihydrat (90208, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Triethylamin (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (T1378, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tween®-20 (8.17072, Merck, Darmstadt)

Wasserstoffperoxid (30 %) (95321, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L,0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P,0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

6.1.4.2 Antikörper und Antigene

Kommerziell erhältliche Antikörper:

Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L), (01-13-06, Medac, Wedel)

Ziege anti-Schwein IgG (H+L) (01-14-06, Medac, Wedel)

Ziege anti-Schwein IgG (H+L), HRP-Konjugat (14-14-06, Medac, Wedel)

Die Lyophilisate der Antikörper wurden in destilliertem Wasser gelöst und aliquotiert. Die Aliquote wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Folgende Aliquote lagen vor:

Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L), 5 mg/mL, 10 µL

Ziege anti-Schwein IgG (H+L): 5 mg/mL, 10 µL

Ziege anti-Schwein IgG (H+L), HRP-Konjugat: 0,5 mg/mL, 50 µL

Antigene für die Immobilisierung:

Die verwendeten Antigene wurden von Mikroorganismen produziert. Die Stammlösungen aller Antigene wurden bis zur Verwendung bei -80 °C aliquotiert aufbewahrt. Folgende Antigenlösungen wurden getestet:

Hepatitis E-Virus (HEV)

ORF2C-gt1 (1,06 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,05 % SDS (pH 7,2)

ORF2C-gt1 (1,48 mg/mL) in 20 mM TRIS, 2 mM DTE, 8 M Harnstoff (pH 7,0)

ORF2C-gt3 (0,62 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,05 % SDS (pH 7,2)

ORF2C-gt3 (2,06 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,05 % SDS (pH 7,2)

ORF2C-gt3 (2,06 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,02 % SDS (pH 7,2)

ORF2C-gt3 (1,12 mg/mL) in 20 mM TRIS, 2 mM DTE, 8 M Harnstoff (pH 7,0)

ORF3 (0,20 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,05 % SDS (pH 7,2)

Im Folgenden werden die ORF2-basierten Antigene als O2C, das Antigen auf Basis von ORF3 als O3 abgekürzt.

Yersinia spp.

YopD (0,28 mg/mL) in 20 mM MOPS, 10 mM DTE, 0,01 % SDS (pH 7,2)

6.1.4.3 Probenmaterial

Schweineserum (S2400, Biowest, Nuaille, Frankreich), bezeichnet als Probe PS

Alle Realproben wurden an verschiedenen bayerischen Schlachthöfen im Zeitraum zwischen 2009 und 2012 gewonnen. Die Proben wurden während des Ausblutens der Schweine genommen, wobei zwischen 10 und 30 mL Blut pro Schwein in sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden. Die Proben wurden gekühlt transportiert, am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit (LMU) zentrifugiert und die Seren in Aliquoten bei -20 °C gelagert. Für die Messungen am IWC wurden die Seren ohne Unterbrechung der Kühlkette überführt, dort einmalig aufgetaut und in 100 µL Einheiten bis zum Gebrauch wieder eingefroren. Nach dem Auftauen für die erstmalige Messung wurden die Proben für maximal 5 Tage bei 4 °C zur Weiterverwendung gelagert.

Für die Testung auf anti-HEV IgG standen 27 Seren (H 01 – H 27) zur Verfügung, für anti-*Yersinia* IgG 21 Seren (Y 01 – Y 21). Die Herkunft bzw. das Probenahmedatum der einzelnen Seren sind in Anhang B tabellarisch erfasst.

Zusätzlich wurden von der Fa. Mikrogen die für die Evaluierung des von Mikrogen entwickelten und von Prionics vertriebenen ELISA-Kits PrioCheck® HEV porcine für die

Beurteilung des im Rahmen dieser Arbeit selbst entwickelten ELISA-Verfahrens bereitgestellt. Neben Positiv-, Cut-Off-, und Negativkontrollserum stand das für die Einstellung der Positivkontrolle verwendete hochpositive Serum in unverdünnter, stabilisierter Form zur Verfügung.

Zur Austestung als Blindprobe wurde von der Fa. Mikrogen ein Realserum mittels Protein A/G-Säule von allen IgG-Antikörpern aufgereinigtes Serum hergestellt, welches nach der Elution einen 30 %-igen Anteil an Konjugatpuffer (stabilisierter HEPES-Puffer) aufweist.

6.1.4.4 Verwendete Pufferlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Puffer verwendet. Zur Herstellung wurde stets UV-vorbehandeltes destilliertes Wasser eingesetzt.

Blockingpuffer I TRIS-HCl-Puffer (pH 8,5)

121,10 g (1 M) TRIS

37 % (v/v) HCl

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Blockingpuffer II TRIS-HCl-Puffer (pH 7,8)

121,10 g (1 M) TRIS

8,77 g (150 mM) NaCl

37 % (v/v) HCl

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Blockingpuffer III

20,00 g (2,0 % w/v) Casein

PBS-Puffer, ad 1.000 mL (Erhitzen)

Blockingpuffer IV

10,00 g (1,0 % w/v) BSA

PBST, ad 1.000 mL

Blockingpuffer ELISA

10,00 g (1,0 % w/v) Casein

PBS, ad 1.000 mL (Erhitzen)

Carbonatpuffer (pH 9,6)

1,59 g (15 mM) Na₂CO₃

2,93 g (35 mM) NaHCO₃

0,20 g (3 mM) NaN₃

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Coatingpuffer ELISA (pH 9,6)

1,54 g (10 mM) DTT

Carbonatpuffer, ad 1.000 mL

Laufpuffer MCR 3 I

5,00 g (0,5 % w/v) Casein

PBS-Puffer, ad 1.000 mL (Erhitzen)

Laufpuffer MCR 3 II (PBST)

0,50 mL (0,05 % v/v) Tween®-20

PBS-Puffer, ad 1.000 mL

PBS-Puffer (pH 7,6)

12,20 g (70 mM) K₂HPO₄

1,36 g (10 mM) KH₂PO₄

8,50 g (145 mM) NaCl

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Regenerationspuffer (pH 2)

7,51 g (10 mM) Glycin

5,85 g (100 mM) NaCl

1,00 g (0,1 % w/v) SDS

37 % (v/v) HCl

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Spottingpuffer I (für Antikörper)

50 mg (0,005 % w/v) Pluronic

125,00 g (12,5 % w/v) Trehalose Dihydrat

PBS-Puffer, ad 1.000 mL

Spottingpuffer II (für HEV ORF2C-gt1, ORF3-gt3)

4,19 g (20 mM) MOPS

1,54 g (10 mM) DTE

0,50 g (0,05 % w/v) SDS

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Spottingpuffer III für YopD

4,19 g (20 mM) MOPS

1,54 g (10 mM) DTE

0,10 g (0,05 % w/v) SDS

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Spottingpuffer IV (für HEV ORF2C-gt3), Renaturierungspuffer

4,19 g (20 mM) MOPS

1,54 g (10 mM) DTT

100 µL (0,01 % v/v) Tween®-20

Substratpuffer ELISA (pH 3,8)

46,04 g (200 mM) $C_6H_7KO_7$

0,10 g (0,67 mM) $C_6H_7KO_2$

Reinstwasser, ad 1.000 mL

Waschpuffer ELISA (pH 7,6)

55 mg (0,40 mM) KH_2PO_4

49 mg (0,28 mM) K_2HPO_4

35 mg (0,60 mM) NaCl

202 µL Tween 20

Reinstwasser, ad 1.000 mL

6.2 Herstellung von Protein-Mikroarrays

6.2.1 Herstellung von Amino-PEG-Chipoberflächen (SOP für 20 Chips)

6.2.1.1 Vorbereitung und Reinigung

Im ersten Schritt werden kommerziell erhältliche Glasobjektträger in der jeweils unteren rechten Ecke mit einem Glasdiamantstift fortlaufende Ziffern für die spätere Dokumentation eingraviert. Die gravierte Seite markiert dabei für die weitere Verwendung die unbeschichtete Seite der Glasobjektträger. Um Verunreinigungen zu entfernen, werden die Glasobjektträger in einer Färbeschale mit 200 mL einer 2 %-igen wässrigen Hellmanexlösung für 1 h in das Ultraschallbad, anschließend für 15 h bei RT auf den Schüttler und danach erneut für 1 h in das Ultraschallbad gestellt. Die Glasträger werden abschließend gründlich mit 1 L destilliertem Wasser portionsweise fünf Mal gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.2.1.2 Anätzung der Oberfläche

Nach der Reinigung werden die Glaschips zur Anätzung der Oberfläche in eine Färbeschale mit 200 mL einer frisch vorbereiteten Mischung aus 37 % HCl und Methanol (1:1) getaucht und 1 h bei RT und leichter Schüttelbewegung inkubiert. Die Glaschips werden mit 1 L destilliertem Wasser gespült und anschließend 1 h in der Färbeschale mit 200 mL konzentrierter Schwefelsäure bei RT geschüttelt. Danach werden die Objektträger fünf Mal mit je 200 mL destilliertem Wasser gründlich gespült, im Stickstoffstrom gleichmäßig getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert.

6.2.1.3 Silanisierung mit GOPTS

Die Glaschips werden einzeln mit der markierten Seite nach unten auf je zwei Schnappdeckel in Petrischalen gelegt. 600 μ L GOPTS werden auf der Chipoberfläche verteilt und diese mit einem weiteren Chip mit der markierten Seite nach oben als Sandwich belegt. In geschlossenen Petrischalen werden die Chips für 3 h bei RT gelagert. Die Sandwichchips werden danach manuell in Ethanol getrennt und in den Trägereinsatz einsortiert. In der Färbeschale werden die silanisierten Chips zunächst in 200 mL Ethanol, dann in 200 mL Methanol und erneut in 200 mL Ethanol für je 10 min im Ultraschallbad gereinigt.

Die beschichteten Objektträger werden für 30 min bei 98 °C vollständig getrocknet. Die Chips werden visuell auf Schlieren kontrolliert.

6.2.1.4 Beschichtung mit Diamino-PEG

Für die Beschichtung von 20 Glaschips werden ca. 10 g Diamino-PEG (2.000 Da) im Trockenschrank bei 98 °C geschmolzen. Die Chips werden mit der silanisierten Seite nach oben in die Petrischalen gelegt, mit je 600 µL flüssigem Diamino-PEG belegt und mit einem zweiten Chip bedeckt. Die Schalen werden verschlossen im Trockenschrank für 15 h bei 98 °C gelagert. Die Sandwichchips werden dann in destilliertem Wasser getrennt, sorgfältig gewaschen und zur Reinigung zweimal für je 15 min unter Austausch des Wassers in der Färbeschale ins Ultraschallbad gestellt. Die hergestellten Amino-PEG-Mikroarray-Chips werden in Plastikbehältern im Exsikkator unter Vakuum gelagert und sind mehrere Wochen stabil.

6.2.2 Aktivierung von Amino-PEG-Chipoberflächen (SOP für 20 Chips)

6.2.2.1 Kopplung des Diepoxy-PEGs

Die Amino-PEG-Chips werden mit je 600 µL Diepoxy-PEG belegt und im Sandwich-Format in einer geschlossenen Glasschale für 15 h bei 98 °C im Trockenschrank aufbewahrt. Anschließend werden die Chips im heißen Zustand in Methanol getrennt. Die Reinigung erfolgt unter Austausch von Methanol in Färbeschalen im Ultraschallbad für zweimal 15 min. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom und visueller Kontrolle werden die Epoxy-PEG-Chips direkt für den Spottingprozess eingesetzt.

6.2.2.2 Aktivierung von Amino-PEG-Chips mit DSC

Für die Aktivierung werden 360 mg DSC und 20 mg DMAP in 6 mL trockenem DMF gelöst und mit 450 µL Triethylamin versetzt. Pro Sandwich werden 600 µL dieser Lösung auf einen mit Diamino-PEG belegten Glaschip pipettiert und mit einem weiteren Diamino-PEG-belegten Glaschip bedeckt. Es folgt eine vierstündige Inkubation bei Raumtemperatur in geschlossenen Petrischalen. Die Sandwiches werden in Methanol getrennt, sofort in eine

Färbeschale mit 200 mL Methanol überführt und zweimal für je 5 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips werden im Stickstoffstrom vollständig getrocknet, visuell kontrolliert und für den Spottingprozess verwendet.

6.2.3 Immobilisierung der rekombinanten Antigene und Kontrollantikörper

6.2.3.1 Vorbereitung der Spottinglösungen

Die Vorbereitung der Spottinglösungen erfolgte in Abhängigkeit der zu übertragenden Proteine auf verschiedene Weise. Die als Positivkontrolle getesteten Antikörper Ziege anti-Schwein IgG bzw. Kaninchen anti-Ziege IgG wurden in einem PBS-Puffer mit Zusatz von Trehalose und Pluronic F127 gelöst. Dazu wurden 10 μL der Antikörper-Stammlösung (5 mg/mL) mit 90 μL PBS-Puffer, versetzt mit 0,005 % (w/v) Pluronic F127 und 12,5 % (w/v) Trehalose Dihydrat, mit Hilfe eines Vortexers vermischt. Diese Antikörperlösungen wurden für maximal drei Spottingprozesse verwendet, wobei sie bis zu jedem Gebrauch bei -20 °C gelagert wurden. Pro Spottingdurchgang wurden ca. 30 μL der jeweiligen Antikörperkontrollen in die Kavitäten einer 384-*well*-Mikrotiterplatte überführt.

Für die Immobilisierung der rekombinanten Antigene wurden sowohl die verschiedenen Antigen-Stammlösungen direkt für den Spottingprozess verwendet, als auch Verdünnungen der Stammlösungen und Lösungen, bei denen ein Pufferaustausch vorgenommen wurde. Bei der direkten Verwendung der Stammlösung wurde die benötigte Menge der bei -80 °C gelagerten Aliquote (35 μL) aufgetaut, in die Titerplatte überführt und möglichst zeitnah für das *Spotting* verwendet. Für Titrationsversuche wurde die Stammlösung mit dem jeweiligen Puffergemisch in den gewünschten Verhältnissen verdünnt und je ca. 35 μL in die 384-*well* Mikrotiterplatte gegeben.

Für die Überführung von SDS- bzw. Harnstoff-haltigen Stammlösungen in ein renaturierendes Medium wurde zum einen der Pufferaustausch mittels Dialysemembran, zum anderen der Puffertausch nach Ultrazentrifugation der Proteinlösungen getestet. Für die Dialyse wurden 50 μL der Stammlösungen in eine Dialysemembran (\varnothing 6,4 mm, MWCO 6.000 - 8.000 Da) pipettiert, diese mit Verschlussklammern abgedichtet und die Membran in einem Becherglas, das den Renaturierungspuffer enthielt, getaucht. Die Dialyse wurde für 15 h bei RT und leichtem Rühren durchgeführt. Der dialysierte Inhalt der Membran wurde anschließend in die Mikrotiterplatte transferiert. Der Pufferaustausch mittels Amicon-

Ultrazentrifugationseinheiten bestand aus zwei Schritten. Zunächst wurden 50 µL der jeweiligen Stammlösung in die Filtereinheit gegeben und mit 450 µL des Renaturierungspuffers versetzt. Nach Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm) wurde der Rückstand (ca. 20 - 25 µL) durch Überkopf-Zentrifugation (2 min, 1.000 rpm) wiedergewonnen und für den Spottingprozess möglichst zeitnah eingesetzt.

6.2.3.2 Einstellungen und Durchführung des Spottingprozesses

Zur Immobilisierung der Antigene und Antikörper auf den aktivierten Chipoberflächen wurde der Kontaktpotter BioOdyssey Calligrapher von Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet. Abbildung 6.1 zeigt das verwendete Spottersystem. Bei der Spottingnadel handelte es sich um einen Solid Pin SNS 9 mit einem Übertragungsvolumen von 3,3 nL. Die Temperatur während des automatischen Spottingvorgangs wurde auf 20 °C eingestellt, die relative Luftfeuchtigkeit im Inneren des Geräts betrug 50 %.

Die Mikroarray-Chips für den MCR 3 besitzen zwei identische getrennte Messkanäle, die mit einem je nach Messanforderung in x-Richtung variablen Array-Muster angefertigt werden. Pro Analyt wurden in y-Richtung 5 Replikate gespottet. Der Spotabstand betrug in y-Richtung 1,1 mm und der Reihenabstand in x-Richtung 1,3 mm. Der Abstand zwischen den beiden Arrays wurde gleichbleibend auf 11,75 mm eingestellt. Je ca. 30 µL der zu spottenden Antigenlösungen sowie der Positivkontrollen wurden in einer MTP mit 384 Kavitäten vorgelegt. Die fertiggestellten Protein-Mikroarray-Chipoberflächen wurden in geschlossenen Petrischalen 15 h bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % im Klimaschrank inkubiert.

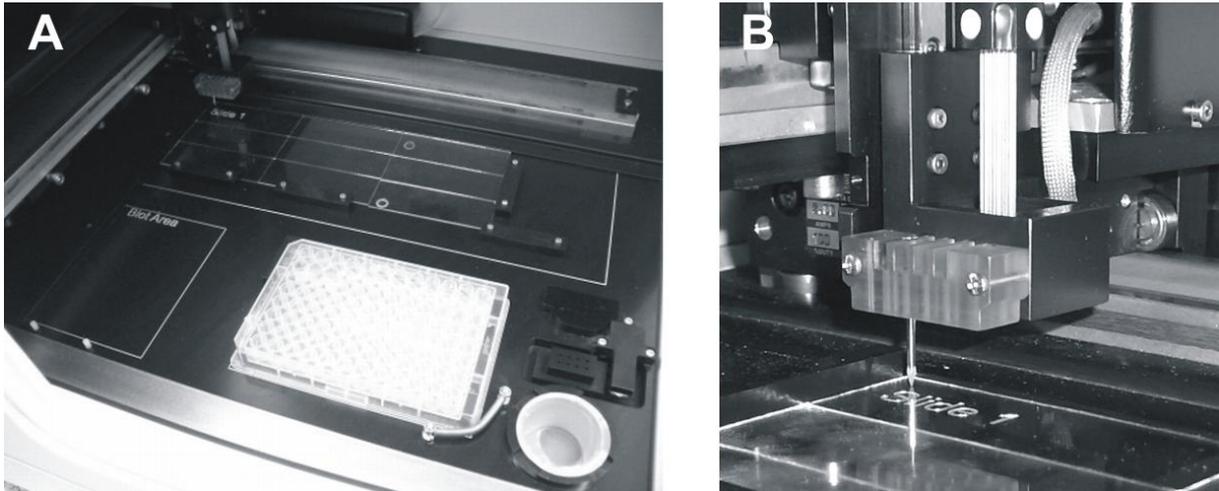


Abbildung 6.1: Gesamtübersicht des verwendeten Kontaktpotters mit Chipauflagefläche, MTP als Reservoir und Waschvorrichtung (a), Greifarm mit Stahlnadel zum Kontaktdruck (b).

Während der Optimierungsphase des Antigen-Mikroarrays am Beispiel der rekombinanten HEV-Antigen O2C-gt1 und O2-gt3 wurde eine Anordnung der Spots auf dem Chip verwendet, bei der das Antigen O2C-gt1 in zwei Konzentrationen jeweils mehrfach aufgebracht wurde, um eine Aussage über die Homogenität der Oberflächenbeschichtung, die Qualität des Spottingprozesses und die Reproduzierbarkeit des Durchfluss-Assays zu erhalten. Die dabei verwendete Array-Anordnung ist in Tabelle 6.1 in Fließrichtung wiedergegeben.

Tabelle 6.1: Verwendetes Array für die HEV-Antikörper-Diagnostik.

| <i>Spalte Nr.</i> | <i>Belegung</i> | <i>Puffer</i> |
|-------------------|------------------|--------------------|
| 1 | Negativkontrolle | Spottingpuffer IV |
| 2 | Positivkontrolle | Spottingpuffer I |
| 3 | Negativkontrolle | Spottingpuffer IV |
| 4 | O2C-gt1 | Spottingpuffer II |
| 5 | O2C-gt1 (1:2) | Spottingpuffer II |
| 6 | O2C-gt1 | Spottingpuffer II |
| 7 | O2C-gt1 (1:2) | Spottingpuffer II |
| 8 | Negativkontrolle | Spottingpuffer IV |
| 9 | O2C-gt3 | Spottingpuffer III |
| 10 | O2C-gt3 | Spottingpuffer IV |
| 11 | Negativkontrolle | Spottingpuffer IV |
| 12 | O2C-gt1 | Spottingpuffer II |
| 13 | O2C-gt1 (1:2) | Spottingpuffer II |
| 14 | O2C-gt1 | Spottingpuffer II |
| 15 | O2C-gt1 (1:2) | Spottingpuffer II |
| 16 | Positivkontrolle | Spottingpuffer I |

6.2.4 Inaktivierung der Antigen-Mikroarray-Chipoberflächen

Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, verbliebene reaktive Epoxy- bzw. Estergruppen zu inaktivieren, sowie die unspezifische Adsorption von Serumproteinen auf den Chipoberflächen zu minimieren, wurden verschiedene Protokolle zur Oberflächenbehandlung getestet. Im Folgenden ist das optimierte Verfahren wiedergegeben.

Die inkubierten Mikroarray-Chips wurden in eine Färbeschale mit 200 mL TRIS-HCl (pH 7,8; Blockingpuffer II) getaucht und für 15 min auf den Schüttler gestellt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST folgte ein zweiter Blockingschritt mit BSA-haltigem PBST-Puffer (pH 7,6; Blockingpuffer IV) unter Schütteln für 30 min. Anschließend wurden die geblockten Chips mit PBST gewaschen und abschließend für 15 min auf dem Schüttler mit PBST gereinigt. Die geblockten Mikroarray-Chips wurden im Stickstoffstrom gründlich getrocknet und für die Herstellung der Durchflusszellen verwendet.

6.2.5 Fertigung der Mikroarray-Durchflussmesszellen

Die Flusszellen werden durch Anbindung des Glasobjektträgers an einen schwarzen PMMA-Träger mittels einer Klebefolie gebildet. Dazu wird der Kunststoffträger zunächst mit einer doppelseitigen PE-Klebefolie beklebt, bei der die Formen der beiden Messkanäle ausgeschnitten sind. Dann folgt die Befestigung des Glaschips, indem die Oberflächenmodifizierte Seite direkt an dem planaren Träger haftet. Der erhaltene dreiteilige gekapselte Mikroarray-Durchfluss-Chip mit zwei getrennten Messkanälen kann nun zur Messung in die Schublade der Messeinheit am MCR 3 eingelegt werden. Die Bohrungen im Träger dienen dabei der fluidischen Anbindung in Form von Ein- und Auslassöffnungen (siehe Abb. 6.2).



Abbildung 6.2: Aufbau des dreiteiligen gekapselten Durchfluss-Chips mit zwei Messkanälen (a), Schublade für die fluidische Anbindung des Durchfluss-Chips an das Kapillarsystem des MCR 3 (b).

6.3 Messungen mit Schweineseren am MCR 3

6.3.1 Durchführung und Messprogramm

Für die Messungen am MCR 3 wurden die bei -20 °C gelagerten Serumproben aufgetaut und mittels Vortexer homogen durchmischt. Anschließend wurden die Seren 1+100 mit PBST verdünnt, um Matrixeffekte zu reduzieren. Die benötigte Menge an Detektionsantikörper wurde ebenfalls aufgetaut und 1+500 mit PBST verdünnt, wobei eine Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ des Ziege anti-Schwein-HRP-Konjugats resultierte.

Nach einem Waschprogramm mit destilliertem Wasser wurde die Antikörperspritze P1 mit der Antikörperlösung befüllt und die jeweiligen Schläuche des MCR 3 mit Laufpuffer, Antikörperlösung bzw. Chemilumineszenz-Substraten befüllt.

Bevor die erste Probenmessung gestartet wurde, wurde der Messchip eingelegt, die Durchflusszellen mit Laufpuffer gefüllt und ein Kamerabild als Blankmessung aufgenommen. Dieser Kamera-Blank wurde von der verwendeten Software automatisch vom späteren Messbild abgezogen, um Fehlpixel und durch Lichteinfall verursachte Störungen zu eliminieren.

Der Programmablauf des optimierten Messprogramms zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen pathogene Erreger in Schweineseren bestand aus 108 Einzelschritten. Die detaillierte Darstellung des Messablaufs inklusive Angabe der einzelnen Ventilpositionen findet sich zur vollständigen Dokumentation im Anhang B. Die wesentlichen Programmschritte sind im Folgenden wiedergegeben.

Die Probenspritze P2 wurde mit 1.000 μL der verdünnten Serumprobe befüllt und in das Messgerät eingelegt. Um das Eindringen von Luftblasen in das Kapillarsystem zu vermeiden, wurden zunächst 100 μL der Probe direkt in den Abfall gegeben. 900 μL der Probe wurden über den Chip geleitet, wobei 200 μL Probe mit einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{L}/\text{s}$, die verbleibenden 700 μL Probe mit 10 $\mu\text{L}/\text{s}$ zugegeben wurden. Anschließend wurde 1.000 μL Laufpuffer PBST aus P2 mit einer Flussrate von 10 μL über den Chip gegeben, um die im Schlauch verbliebene Serumprobe komplett über den Chip zu leiten. Dieser erste Assay-Schritt wurde von einem Waschschrift mit PBST aus P5 (2.000 μL mit 500 $\mu\text{L}/\text{s}$) gefolgt. Die Detektion der gebundenen IgG-Antikörper erfolgte mit einer Lösung des 1+500 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PBST verdünnten Ziege anti-Schwein IgG-HRP-Konjugats. Die Zugabe von 1.000 μL dieser Lösung erfolgte aus der Spritzenpumpe P0, die Flussrate betrug 100 $\mu\text{L}/\text{s}$ für die ersten 200 μL der Probe bzw. 10 $\mu\text{L}/\text{s}$ für die restlichen 800 μL . Während der Zugabe des Detektionsantikörpers wurden die Probenspritze und die Schlauchzuführung zum Ventil 6 insgesamt acht Mal mit je 1.000 μL Laufpuffer gespült. Im Anschluss wurde ein zweiter Waschschrift aus Pumpe P5 (2.000 μL bei einem Fluss von 500 $\mu\text{L}/\text{s}$) durchgeführt. Die Auslesung des Chemilumineszenz-Assays erfolgte durch Zugabe der beiden Chemilumineszenz-Substrate, welche im Verlauf der vorangegangenen Prozess-Schritte im Wechsel in 50- μL -Einheiten in Pumpe P3 aufgezogen worden waren, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Das Substratgemisch wurde in einem Gesamtvolumen von 400 μL und einer Geschwindigkeit von 150 $\mu\text{L}/\text{s}$ über den Chip geleitet. Die resultierende

Chemilumineszenzreaktion wurde über einen Zeitraum von 60 s mit Hilfe der 16-bit CCD-Kamera aufgenommen und die Daten als „.txt“-Datei automatisch abgespeichert, wobei das vor der Probenmessung aufgenommene Kamera-Blankbild vom Messbild subtrahiert wurde. Nach Abschluss des Immunoassays folgte ein Waschprogramm, bei dem das verwendete Kapillarsystem zunächst aus der Probenspritze P2 (dreimal mit je 1.000 μL bei einer Flussrate von 250 $\mu\text{L/s}$), dann aus der Spritzenpumpe P4 (dreimal mit je 2.000 μL bei einem Fluss von 500 $\mu\text{L/s}$) intensiv mit PBST gespült wurde. Danach stand das Messgerät für eine Probenmessung auf der zweiten Durchflusszelle bzw. einem weiteren Mikroarray-Chip zur Verfügung.

Am Ende eines Messtages wurde das Gerät intensiv mit Wasser gespült und die Oberflächen mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Das Abfallgemisch aus Serum und Puffer wurde in regelmäßigen Abständen autoklaviert und entsorgt.

6.3.2 Untersuchung von Signal- und Lagerstabilitäten

Für die Untersuchung der Signal- und Lagerstabilitäten von Antigen-Mikroarrays am Beispiel der HEV-Antigene wurde eine Serumprobe (H 12) herangezogen, welche in Bezug auf die vorliegenden Antikörper im mittleren Titer-Bereich der verfügbaren Proben lag. Alle Messungen wurden mit diesem Serum in 1+100-Verdünnung mit PBST durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der Nachweismethode zu überprüfen, wurde eine Mehrtagesstudie über drei einzelne Messtage hinweg durchgeführt, welche sowohl die Varianzen in der Chipherstellung und der Immobilisierung als auch die Varianz der Mikroarray-Auslesung mittels Durchfluss-Immunoassay widerspiegeln sollte. Dafür wurden für jeden der drei Versuchstage Amino-PEG-Chips aus jeweils verschiedenen Herstellungschargen mit den rekombinanten HEV-Antigenen O2C-gt1 (Stammlösung mit 0,05 % SDS) und O2C-gt3 (Stammlösung mit 0,05 % SDS), sowie der Positivkontrolle Ziege anti-Schwein IgG beschichtet. Dabei wurde das Antigen O2C-gt3 vor der Verwendung jedes Mal in SDS-freies Medium umgepuffert (siehe 6.2.3.1). Das Antigen O2C-gt1 wurde in der Konzentration der Stammlösung, sowie deren 1:2-Verdünnung getestet.

Für die Herstellung der Detektionsantikörperlösung und der 1+100-Verdünnung der Serumproben wurden an jedem Versuchstag frische Aliquote eingesetzt. Alle Antigen-

Mikroarray-Chips wurden mit Serum H 12 unter Verwendung des im Anhang angegebenen Messprogramms beprobt.

Analog dazu wurden HEV-Antigen-Mikroarrays mit dem als Blindprobe verwendeten Serum H 27 analysiert, um daraus ein Cut-Off-Niveau abzuschätzen.

Die Signalstabilität von Mikroarrays basierend auf dem Antigen YopD zum Nachweis von *Yersinia* IgG wurde ebenfalls in Form einer Mehrtagesstudie überprüft. Dazu wurden Mikroarrays mit dem rekombinanten Antigen YopD (Stammlösung mit 0,01 % SDS) hergestellt und mit der Serumprobe Y 2 untersucht. Der Cut-Off-Wert wurde aus Messungen mit der Blindprobe Y 21 über drei Messtage hinweg ermittelt.

Für die Untersuchung der Lagerstabilität wurden analog zur Reproduzierbarkeitsstudie Antigen-Mikroarrays mit beiden HEV-Antigenen hergestellt. Alle für den Test benötigten Mikroarray-Chips wurden an einem Tag gefertigt und nach Inkubation und Blocken unter verschiedenen Bedingungen für zwei Wochen gelagert. Als Lagerbedingungen wurden die Lagerung bei RT, die Lagerung bei 4 °C, sowie die Lagerung bei -20 °C ausgewählt. Zur Referenzierung der Messsignale wurden mehrere Chips direkt nach dem Blocken mit Serum H 12 gemessen.

6.3.3 Verdünnungsexperimente und Serenscreening

Für die Durchführung der Verdünnungsexperimente wurden Antigen-Mikroarrays wie unter Kapitel 6.3.2 beschrieben hergestellt. Um einen möglichst großen Konzentrationsbereich an IgG-Antikörpern gegen HEV bzw. pathogene *Yersinien* abzudecken, wurden jeweils Seren ausgewählt, die in Vortests als bezüglich der Zielantikörper hochpositiv eingestuft werden konnten. Für die Verdünnungsreihe der HEV-Antikörper wurde das Serum H 2 ausgewählt, für anti-*Yersinia* IgG das Serum Y 2. Diese beiden Seren wurden mit den korrespondierenden Blindproben H 27 bzw. Y 21 definiert verdünnt, wobei Verdünnungsfaktoren von 1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100, 1:400 und 1:1.000 ausgewählt wurden. Die resultierenden Serumproben mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen wurden vor der Messung 1+100 mit PBST verdünnt. Für jede Messung wurde ein neuer Antigen-Mikroarray verwendet, wobei beide Flusszellen einzeln kalibriert wurden. Die Messung der jeweils neun Serumproben erfolgte in absteigender Konzentrationsfolge.

Das Screening aller verfügbaren Seren auf HEV IgG (H 01 – H27) bzw. *Yersinia* IgG (Y 01 – Y21) erfolgte über mehrere Messtage hinweg. Hierbei wurde jede Serumprobe auf einer Flusszelle gemessen. Die Beurteilung der Seren erfolgte auf Basis der zuvor für die Evaluierung der Seren berechneten Cut-Off-Werte für den jeweiligen Zielantikörper.

6.4 ELISA-Messungen von Schweineseren

6.4.1 Durchführung eines Mikrotiterplatten-ELISAs (SOP)

6.4.1.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Antigenen

Für die Beschichtung einer hochbindenden Mikrotiterplatte (PS, 96-well) werden 100 µL der jeweiligen Antigen-Lösung in jede Kavität überführt. Die optimierte Antigen-Konzentration beträgt für alle getesteten Antigene 12,5 ng/well, als Beschichtungspuffer wird Carbonatpuffer (pH 9,6) mit Zusatz von 10 mM DTT verwendet. Die Mikrotiterplatte wird bei 4 °C für 15 h inkubiert. Die beschichtete Platte wird nach der Inkubation am Waschautomaten dreimal mit Waschpuffer (pH 7,6) gewaschen.

6.4.1.2 Inaktivierung

Um die unspezifische Adsorption von Antikörpern und Serumproteinen an der Oberfläche der Kavitäten zu minimieren, wird die Mikrotiterplatte mit einer 1 %-igen Casein-Lösung in PBS geblockt. Dafür werden je 200 µL der Casein-Lösung in die Kavitäten pipettiert und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird anschließend am Waschautomaten dreimal mit Waschpuffer (pH 7,6) gewaschen.

6.4.1.3 Inkubation mit Serumprobe

Die zu untersuchenden Serumproben werden 1+100 mit PBS verdünnt und je 100 µL der Probenlösungen in die Kavitäten der Antigen-beschichteten Platte überführt. Diese Mikrotiterplatte wird im Schüttelinkubator bei 37 °C und unter leichtem Schütteln (100 rpm)

für 1 h inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Platte am Waschautomaten dreimal mit Waschpuffer (pH 7,6) gewaschen.

6.4.1.4 Zugabe des Detektionsantikörpers

Als Detektionsantikörper wird ein Ziege anti-Schwein-HRP-Konjugat verwendet. Dieses wird in einer Verdünnung von 1:25.000 in PBS (20 ng/mL) hergestellt und 100 µL der Lösung in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Inkubationzeit im Schüttelinkubator beträgt 30 min bei 37°C und 100 rpm. Anschließend erfolgt der Waschschrift am Spülautomaten.

6.4.1.5 Zugabe der Farbsubstrate und Bildauswertung

Für die Farbreaktion werden 138 µL einer 1 %-igen H₂O₂-Lösung in 15 mL Substratpuffer (pH 3,8) vorgelegt und mit 273 µL TMB-Lösung (375 mg in 30 mL DMSO) versetzt. Diese Substratlösung wird anschließend sofort in die Mikrotiterplatte pipettiert (100 µL/Kavität) und auf dem Schüttler inkubiert. Die Farbreaktion wird durch Zugabe einer 5 %-igen H₂SO₄-Lösung nach ca. 8 - 10 min gestoppt. Die Absorption wird am MTP-Auslesegerät Synergy HT bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit Hilfe der Gen5 Microplate Data Collection + Analysis Software automatisch ausgewertet.

6.4.2 Untersuchung der Antigen-Aktivitäten

Für die Untersuchung der Antigen-Aktivitäten wurden verschiedene Puffer zur Beschichtung der Mikrotiterplatten mit rekombinanten HEV-Antigenen ausgetestet. Hierzu wurde der Standard-Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer, pH 9,6) mit verschiedenen Konzentrationen bzw. Kombinationen an Harnstoff, SDS und DTT versetzt. Für die Versuche wurden sowohl Antigene aus MOPS-SDS-Puffersystemen als auch aus Tris-Harnstoff-Puffersystemen verwendet. Die Beurteilung der resultierenden Reaktivität erfolgte dabei mit Kontrollseren der Fa. Mikrogen, die kommerziell im ELISA-Kit PrioCheck® HEV porcine zum Einsatz kommen. Alle Seren wurden mittels Dreifachbestimmung analysiert. Für den Test der verschiedenen HEV-Antigene in unterschiedlichen Beschichtungspuffern wurden die 96 Kavitäten der hochbindenden Mikrotiterplatte in Einheiten eines 4 x 3-Musters aufgeteilt, so dass bis zu acht verschiedene Kombinationen auf einer Platte vergleichend untersucht werden

konnten. Als Referenz diente bei allen Platten die Verwendung von reinem Carbonatpuffer für die Immobilisierung.

6.4.3 Verdünnungsexperimente und Serenscreening

Für die durchgeführten Verdünnungsexperimente und das Serenscreening wurden Antigenbeschichtete Mikrotiterplatten nach der in 6.4.1 beschriebenen Standardprozedur hergestellt. Für diese Experimente wurden die MOPS-SDS-Stammlösungen der HEV-Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 sowie des Yersinien-Antigens YopD mit dem optimierten Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer mit Zusatz von 10 mM DTT) auf eine finale Konzentration von 125 ng/mL eingestellt. Für die Titrationsreihen wurden analog zu den Mikroarray-Experimenten die Seren H 2 (hochpositiv bezüglich anti-HEV IgG) bzw. Y 2 verwendet. Diese Seren wurden mit den entsprechenden Blindproben H 27 bzw. Y 21 auf die Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100 und 1:1.000 gebracht. Alle Proben wurden in 1+100-Verdünnung mit PBS in Dreifachbestimmung gemessen.

Das Serenscreening wurde mit den angegebenen Antigenen ebenfalls in Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei alle Proben hinsichtlich eines Antigens auf einer Mikrotiterplatte analysiert werden konnten.

6.5 LIA-Messungen von Schweineseren

6.5.1 Durchführung eines LIAs (SOP)

Die Testung von Seren auf die Existenz von anti-HEV IgG erfolgte mit Hilfe des Testkits *recomLine HEV IgG/IgM* (Mikrogen, Neuried). Dieser Teststreifen-basierte LIA ist für den Nachweis von anti-HEV-Antikörpern in Humanseren kommerziell erhältlich. Dieses Testformat enthält die rekombinanten HEV-Antigene ORF2C (Genotyp 1, Genotyp 3), ORF2N (Genotyp 1, Genotyp 3), ORF2M (Genotyp 1) und ORF3 (Genotyp 1, Genotyp 3) sowie eine Reaktionskontrollbande, zwei Konjugatkontrollbanden (IgG/IgM) und eine Cut-Off-Kontrollbande, welche auf einem Nitrocellulose-Membran-Teststreifen immobilisiert sind. Um mit diesem Test Schweineseren zu untersuchen, wurde als Detektionsantikörper Kaninchen anti-Schwein IgG-HRP-Konjugat verwendet.

Die LIA-Messungen wurden in den Laboren des Projektpartners Mikrogen mit den dort vorhandenen Puffer- und Antikörperlösungen durchgeführt und die Ergebnisse vor Ort ausgewertet.

6.5.1.1 Inkubation mit Serumprobe

Die Teststreifen werden einzeln in einer Vertiefung einer Inkubationswanne mit 2.000 µL einer Serum-Lösung (Verdünnung 1+100 in gebrauchsfertigem Verdünnungspuffer) bedeckt und unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Daraufhin werden die Teststreifen zur Reinigung dreimal für je 5 min unter leichtem Schütteln in Waschpuffer eingelegt.

6.5.1.2 Zugabe des Detektionsantikörpers

Die Teststreifen werden mit je 2.000 µL einer gebrauchsfertigen Lösung des HRP-markierten Kaninchen anti-Schwein IgG für 45 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend wiederum dreimal gewaschen.

6.5.1.3 Zugabe der Farbsubstrate und Auswertung

Für die Färbung der Banden werden je Teststreifen 1.500 µL der gebrauchsfertigen Substratlösung zugegeben und diese für 8 min unter leichtem Schütteln inkubiert, wobei eine Blaufärbung der reaktiven Banden zu beobachten ist. Die Reaktion wird durch dreimaliges kurzes Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt.

Nach zweistündigem Trocknen zwischen zwei Lagen saugfähigen Papiers werden die Teststreifen auf einen Auswertebogen geklebt und sowohl visuell als auch mit Hilfe der Software *recomScan* anhand der Graustufenwerte der Reaktionsbanden im Vergleich zur Cut-Off-Kontrollbande ausgewertet.

6.5.2 Verdünnungsexperimente und Serenscreening

Für die Untersuchung des Ansprechverhaltens der LIA-Methode wurden analog zu den ELISA- und Mikroarray-Experimenten auch Teststreifen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der HEV-seropositiven Realprobe H 2 inkubiert und die resultierenden

Bandenfärbungen bezüglich der relevanten Antigene O2C-gt1 und O2C-gt3 ausgewertet. Dabei wurde das Serum H 2 mit dem kommerziellen Verdünnungspuffer 1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100, 1:400 und 1:1.000 verdünnt und pro Verdünnungsstufe zwei Teststreifen beprobt.

Für das Serenscreening wurden die Proben mit jeweils nur einem Teststreifen nach der in Kapitel 6.5.1 dargestellten Prozedur untersucht.

6.6 Messungen von Schweineseren mit ELISA-Kit *pigtype* Yersinia Ab

6.6.1 Durchführung der ELISA-Messungen

Für die Untersuchung von Schweineseren auf *Yersinien*-IgG-Antikörper wurde das kommerziell erhältliche ELISA-Kit *pigtype* Yersinia Ab (1) von Qiagen verwendet. Dieses basiert auf nicht näher definierten Yops, welche auf der Mikrotiterplatte immobilisiert sind. Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß den Instruktionen des Herstellers.

6.6.1.1 Inkubation mit Serumprobe

Je 100 µL/Kavität der Serumproben (Verdünnung 1+100 in Verdünnungspuffer) sowie der gebrauchsfertigen Negativ- und Positivkontrolle wurden in die Kavitäten der Antigenbeschichteten Mikrotiterplatte gefüllt und die Platte für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit 300 µL/Kavität Waschpuffer (Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser) gespült.

6.6.1.2 Zugabe des Detektionsantikörpers

Pro Kavität werden 100 µL des gebrauchsfertigen anti-Schwein IgG-HRP-Konjugats zugegeben und die Mikrotiterplatte für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein zweiter Waschschrift.

6.6.1.3 Farbreaktion und Auswertung

Für die Farbreaktion wurden 100 µL/Kavität der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung für 10 min im Dunkeln bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung

erkennbar war. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe der gebrauchsfertigen Stopplösung (100 μ L/Kavität) beendet. Die Absorptionswerte wurden mit Hilfe des MTP-Auslesegeräts Synergy HT bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und verarbeitet.

6.6.2 Verdünnungsexperimente und Serenscreening

Für die Verdünnungsexperimente und das Serenscreening wurden die Seren mit Hilfe des ELISA-Kits *pigtype* Yersinia Ab (1) nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Versuchsdurchführung analysiert. Für die Titrationsreihen wurden das Serum Y 2 mit der entsprechenden Blindprobe Y 21 auf die Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100, 1:400 und 1:1.000 gebracht. Alle Proben wurden mit Verdünnungspuffer 1+100 verdünnt und in Dreifachbestimmung gemessen.

Das Serenscreening wurde ebenfalls in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| a.u. | <i>Arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit) |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| BMBF | Bundesministerium für Bildung und Forschung |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin) |
| CCD | <i>Charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil) |
| CL | Chemilumineszenz |
| COI | <i>Cut-off-Index</i> |
| CV | <i>Coefficient of variation</i> (Variationskoeffizient) |
| Da | Dalton |
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | N,N'-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| DSC | Disuccinimidylcarbonat |
| ECDC | <i>European Center for Disease Prevention and Control</i> |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| EIA | Enzym-Immunoassay |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) |
| F_c | Konstanter Teil eines Antikörpers |
| FIA | Fließinjektionsanalyse |
| GC | <i>Gas chromatography</i> (Gaschromatographie) |
| GOPTS | 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan |
| GT | Genotyp |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HEV | Hepatitis E-Virus |
| HPLC | <i>High-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| IC₅₀ | Testmittelpunkt |
| IgG / M | Immunglobulin G / M |
| IWC | Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie |

| | |
|----------------|--|
| LIA | <i>Line immunoassay</i> (linearisierter Immunoassay) |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität München |
| LOD | <i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze) |
| MCR 3 | <i>Munich Chip Reader</i> dritter Generation |
| MIA | Mikroarray-Immunoassay |
| MWCO | <i>Molecular weight cut-off</i> (Molekularmasse des Cut-Offs von Filtern) |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| MW | Mittelwert |
| NHS | <i>N-Hydroxysuccinimid</i> |
| O2C, O3 | Abkürzung für die verwendeten HEV ORF-Antigene |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | <i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen) |
| PAH | <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> (Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, PAK) |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-Kochsalz-Puffer) |
| PBST | PBS mit Zusatz von Tween |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| PE | Polyethylen |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| POD | Peroxidase |
| PP | Polypropylen |
| PS | Polystyrol |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| rAg | Rekombinantes Antigen |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| S | Standardabweichung |
| SAM | <i>Self-assembled monolayer</i> (Selbstorganisierte Monolage) |
| SDS | <i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |

| | |
|-------------|--|
| SNR | <i>Signal-to-noise ratio</i> (Signal-zu-Rauschen-Verhältnis) |
| SOP | <i>Standard operating procedure</i> (Standardarbeitsanweisung) |
| SPR | <i>Surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz) |
| TIRF | <i>Total internal reflection fluorescence</i> |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| YopD | <i>Yersinia outer protein D</i> (äußeres <i>Yersinia</i> -Hüllprotein D) |

8 Literaturverzeichnis

Achilles, B., Anstieg von Zoonosen durch den Klimawandel, *Deut. Z. Klin. Forsch.* **2009**, 1/2, 57-60.

Adlhoch, C., Wolf, A., Meisel, H., Kaiser, M., Ellerbrok, H., Pauli, G., High HEV Presence in four Different Wild Boar Populations in East and West Germany, *Vet. Microbiol.* **2009**, 139, 270-278.

Allain, L. R., Stratis-Cullum, D. N., Vo-Dinh, T., Investigation of Microfabrication of Biological Sample Arrays Using Piezoelectric and Bubble-jet Printing Technologies, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 518, 77-85.

Allgemeine Verwaltungsvorschrift des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette (AVV Zoonosen Lebensmittelkette), 10.12.2012.

Anderson, G. P., King, K. D., Cao, L. K., Jacoby, M., Ligler, F. S., Ezzell, Quantifying Serum Antiplague Antibody with a Fiber-optic Biosensor, *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **1998**, 5, 609–612.

Angenendt, P., Glökler, J., Murphy, D., Lehrach, H., Cahill, D. J., Toward Optimized Antibody Microarrays: A Comparison of Current Microarray Support Materials, *Anal. Biochem.* **2002**, 309, 253-260.

Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V., Mirzabekov, Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions, *Anal. Biochem.* **2000**, 278, 123-131.

Aslan, K., Geddes, C. D., Metal-enhanced Chemiluminescence: Advanced Chemiluminescence Concepts for the 21st Century, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2556-2564.

Avseenko, N. V., Morozova, T. Y., Ataulakhanov, F. I., Morozov, V. N., Immobilization of Proteins in Immunochemical Microarrays Fabricated by Electrospray Deposition, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6047-6052.

Backhans, A., Fellstrom, C., Lambertz, S. T., Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Small Wild Rodents, *Epidemiol. Infect.* **2011**, *139*, 1230-1238.

Baechlein, C., Schielke, A., Johne, R., Ulrich, R. G., Baumgaertner, W., Grummer, B., Prevalence of Hepatitis E-Virus-specific Antibodies in Sera of German Domestic Pigs Estimated by Using Different Assays, *Vet. Microbiol.* **2010**, *144*, 187-191.

Baert, F., Peetermans, W., Knockaert, D., Yersiniosis – The Clinical Spectrum, *Acta Clin. Belg.* **1994**, *49*, 76-85.

Baker, W. S., Gray, G. C., Public Veterinary Medicine: Public Health - A Review of Published Reports Regarding Zoonotic Pathogen Infection in Veterinarians, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *234*, 1271-1278.

Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., Poleschuk, V. F., Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route, *Intervirology* **1983**, *20*, 23-31.

Balayan, M. S., Usmanov, R. K., Zamyatina, N. A., Djumalieva, D. I., Karas, F. R., Experimental Hepatitis E Infection in Domestic Pigs, *J. Med. Virol.* **1990**, *32*, 58-59.

Bally, M., Halter, M., Vörös, J., Grandin, H. M., Optical Microarray Biosensing Techniques, *Surf. Interface Anal.* **2006**, *38*, 1442-1458.

Bange, A., Halsall, H. B., Heinemann, W. R., Microfluidic Immunosensor Systems, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2488-2503.

Barbulovic-Nad, I., Lucente, M., Sun, Y., Zhang, M., Wheeler, A. R., Bussmann, M., Bio-microarray Fabrication Techniques - A Review, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2006**, 26, 237-259.

Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Thurairajah, P., Dalton, H. R., Serological Response to Hepatitis E Virus Genotype 3 Infection: IgG Quantitation, Avidity, and IgM Response, *J. Med. Virol.* **2008**, 80, 95-101.

Benninger, G., Zoonosen: Bekannte und neue Infektionskrankheiten – eine Herausforderung für die Forschung an der Schnittstelle von Human- und Veterinärmedizin, *Deut. Z. Klin. Forsch.* **2011**, 5/6, 57-60.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Stryer-Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, München, 6. Auflage **2007**.

BfR, *EHEC-Ausbruch 2011 – Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette*, Hrsg. Appel, B., Böhl, G.-F., Greiner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Hensel, A.; BfR Wissenschaft: Berlin **2011 a**.

BfR, *Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2011*, Hrsg. Hartung, M., Käsbohrer A.; BfR Wissenschaft: Berlin **2011 b**.

BfR, **Information Nr. 010/2008 des BfR**, Risikoorientierte Fleischuntersuchung soll Schweinefleisch sicherer machen, 29.01.2008.

Bhandari, A., Kim, W., Hohn, K., Luminol-Based Enhanced Chemiluminescence Assay for Quantification of Peroxidase and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solutions: Effect of Reagent pH and Ionic Strength, *J. Environ. Eng.* **2010**, 136, 1147-1152.

Bhatia, S. K., Shriver-Lake, L. C., Prior, K. J., Georger, J. H., Calvert, J. M., Bredehorst, R., Ligler, F. S., Use of Thiol-terminal Silanes and Heterobifunctional Crosslinkers for Immobilization of Antibodies on Silica Surfaces, *Anal. Biochem.* **1989**, 178, 408-413.

Borgen, K., Herremans T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes S., Bosman A., Husman, A. M., Koopmans, M., Non-travel Related Hepatitis E Virus Genotype 3 Infections in the Netherlands; a Case Series 2004–2006, *BMC Infect. Dis.* **2008**, 8:61.

Bottone, E. J., *Yersinia Enterocolitica: The Charisma Continues*, *Clin. Microbiol Rev.* **1997**, 10, 257-276.

Bottone, E. J., *Yersinia Enterocolitica: Overview and Epidemiologic Correlates*, *Microbes Infect.* **1999**, 1, 323-333.

Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W. H., Rutjes S. A., de Roda Husman, A. M., Hepatitis E Virus RNA in commercial Porcine Livers in The Netherlands, *J. Food Prot.* **2007**, 70, 2889-2895.

Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes S. A., Wellenberg, G. J., de Roda Husman, A. M, van der Poel, W. H. M., de Jong M. C. M., Estimation of Hepatitis E Virus Transmission among Pigs due to Contact-exposure, *Vet. Res.* **2008**, 39:40.

Bouwknegt, M., Rutjes S. A., Reusken, C.B:E:M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong M. C. M., de Roda Husman, A. M, van der Poel, W. H. M., The Course of Hepatitis E Virus Infection in Pigs after Contact-infection and Intravenous Inoculation, *BMC Vet. Res.* **2009**, 5:7.

Bradley, D. W., Enterically-transmitted Non-A, Non-B Hepatitis, *Brit. Med. Bull.* **1990**, 46, 442-461.

Butler, J. E., Enzyme-linked Immunosorbent Assay, *J. Immunoassay* **2000**, 21, 165-209.

Cano, R. J., Torres, M. J., Klem, R. E., Palomares, J. C., DNA Hybridization Assay Using ATTOPHOS, a Fluorescent Substrate for Alkaline Phosphatase, *Biotechniques* **1992**, 12, 264-269.

Chi, E. Y., Sampathkumar, K., Randolph, T. W., Carpenter, J. F., Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation, *Pharmaceut. Res.* **2003**, *20*, 1325-1336.

Chiem, N. H., Harrison, D. J., Microchip Systems for Immunoassays: An Integrated Immunoreactor with Electrophoretic Separation for Serum Theophylline Determination, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 591-598.

Chobe, L. P., Chadha, M. S., Banerjee, K., Arankalle, V. A., Detection of HEV RNA in Faeces by RT-PCR during the Epidemics of Hepatitis E in India (1976–1995), *J. Viral Hepat.* **1997**, *4*, 129-133.

Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E., Davies, D., Tulip, W., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M., Poljak, R. J., Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions, *Nature* **1985**, *342*, 877-883.

Christensen, P. B., Engle, R. E., Hjort, C., Homburg, K. M., Vach, W., Georgsen, J., Purcell, R. H., Time Trend of the Prevalence of Hepatitis E Antibodies among Farmers and Blood Donors: A Potential Zoonosis in Denmark, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 1026-1031.

Christou, L., The Global Burden of Bacterial and Viral Zoonotic Infections, *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 326-330.

Cohen, M. L., Changing Patterns of Infectious Disease, *Nature* **2000**, *406*, 762-767.

Dankwardt, A., Müller, J., Hock, B., Stabilization of Enzyme Immunoassays for Atrazine, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *362*, 35-45.

Dawson, G. J., Chau, K. H., Cabal, C.M., Yarbough, P.O., Reyes, G. R., Mushahwar, I. K., Solid-phase Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Hepatitis E Virus IgG and IgM Antibodies Utilizing Recombinant Antigens and Synthetic Peptides, *J. Virol. Methods* **1992**, *38*, 175-186.

de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Allepuz, A., Mateu, E., Vidal, D., Ruiz-Fons, F., Martin, M., Gortazar, C., Segales, J., Epidemiological Study of Hepatitis E Virus Infection in European Wild Boars (*Sus scrofa*) in Spain, *Vet. Microbiol.* **2008**, *129*, 163-170.

Delaney, J. T. Jr., Smith, P. J., Schubert, U. S., Inkjet Printing of Proteins, *Soft Matter* **2009**, *5*, 4866-4877.

De Palma, R., Liu, C. X., Barbagini, F., Reekmans, G., Bonroy, K., Laureyn, W., Borghs, G., Maes, G., Magnetic Particles as Labels in Bioassays: Interactions between a Biotinylated Gold Substrate and Streptavidin Magnetic Particles, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12227-12235.

Donhauser, S., Niessner, R., Seidel, M., Rapid and Sensitive Quantification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Campylobacter jejuni* Combining Stopped PCR with Chemiluminescence Flow-through DNA Microarray Analysis, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3153-3160.

Dostalek, J., Pribyl, J., Homola, J., Skladal, P., Multichannel SPR Biosensor for Detection of Endocrine-disrupting Compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1841-1847.

Dremsek, P., Wenzel, J. J., Johne R., Ziller, M., Hofmann, J., Groschup, M. H., Werdermann, S., Mohn, U., Dorn, S., Motz, M., Mertens, M., Jilg, W., Ulrich, R. G., Seroprevalence Study in Forestry Workers from Eastern Germany Using Novel Genotype 3- and Rat Hepatitis E Virus-specific Immunoglobulin G ELISAs, *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 189-200.

Dremsek, P., Joel, S., Baechlein, C., Pavio, N., Schielke, A., Ziller, M., Duerrwald, R., Renner, C., Groschup, M. H., Johne, R., Krumbholz, A., Ulrich, R. G., Hepatitis E Virus Seroprevalence of Domestic Pigs in Germany Determined by a novel In-house and two Reference ELISAs, *J. Virol. Methods* **2013**, *190*, 11-16.

Drobeniuc, J., Meng, J., Reuter, G., Greene-Monfort, T., Khudyakova, N., Dimitrova, Z., Kamili, S., Teo, C.-G., Serologic Assays Specific to Immunoglobulin M Antibodies Against Hepatitis E Virus: Pangenotypic Evaluation of Performances, *Clin. Infect. Dis.* **2010, *51*, e24-e27.**

Dufva, M., Fabrication of High Quality Microarrays, *Biomol. Eng.* **2005, *22*, 173-184.**

Eddowes, M. J., Direct Immunochemical Sensing – Basic Principles and Fundamental Limitations, *Biosensors* **1987, *3*, 1-15.**

EFSA, Scientific Opinion Of The EFSA Panel On Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2009-00877) on an Update of the Present Knowledge on the Occurrence and Control of Foodborne Viruses, *EFSA J.* **2011, *9*:2190.**

EFSA, Scientific Opinion Of The EFSA Panel On Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2007-197): Food Safety Aspects of Different Pig Housing and Husbandry Systems, 06.12.2007.

EFSA, The Report Referred To Article 9 of Directive 2003/99/EC Germany on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and in Humans, Foodstuffs, Animal and Feedingstuffs in 2010, *Download* von <http://www.efsa.europa.eu/en/zoonosesscdocs/zoonosescsumrep.htm> (letzter Aufruf 26.06.2013)

EFSA, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2010, *EFSA J.* **2012, *10*:2597.**

EFSA, The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2011, *EFSA J.* **2013, *11*, 3196.**

Ekins, R. P., Ligand Assays: From Electrophoresis to Miniaturized Microarrays, *Clin. Chem.* **1998, *44*, 2015-2030.**

Elshal, M. F., McCoy, J. P., Multiplexed Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA, *Methods* **2006**, *38*, 317-323.

Emerson, S. U., Purcell, R. H., Recombinant Vaccines for Hepatitis E, *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 462-466.

Emerson, S. U., Nguyen, H., Torian, U., Purcell, R. H., ORF3 Protein of Hepatitis E Virus is not Required for Replication, Virion Assembly, or Infection of Hepatoma Cells in Vitro, *J. Virol.* **2006**, *80*, 10457-10464.

Entscheidung 2002/657/EG der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, 12.08.2002.

Erker, J. C., Desai, S. M., Mushahwar, I. K., Rapid Detection of Hepatitis E Virus RNA by Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction Using Universal Oligonucleotide Primers, *J. Virol. Methods* **1999**, *81*, 109-113.

Ewald, P. W., Waterborne Transmission and the Evolution of Virulence among Gastrointestinal Bacteria, *Epidemiol. Infect.* **1991**, *106*, 83-119.

Faber, M. S., Wenzel, J. J., Jilg, W., Thamm, M., Höhle, M., Stark, K., Hepatitis E Virus Seroprevalence among Adults, Germany, *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1654-1657.

Fall, B., Eberlein-König, H., Behrendt, B., Niessner, R., Ring, J., Weller, M., Microarrays for the Screening of Allergen-specific IgE in Human Serum, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 556-562.

Feagins, A. R., Opriessnig T., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Meng X.-J., Detection and Characterization of Infectious Hepatitis E Virus from Commercial Pig Livers Sold in local Grocery Stores in the USA, *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 912-917.

Feng, Y. F., Ke, Y., Ma, R. S., Chen, P., Hu, G. G., Liu, F. Z., Parallel Detection of Autoantibodies with Microarrays in Rheumatoid Diseases, *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 416-422.

Fernandez, F., Hegnerova, K., Piliarik, M., Saez-Baeza, F., Homola, J., Marco, M. P., A Label-free and Portable Multichannel Surface Plasmon Resonance Immunosensor for on site Analysis of Antibiotics in Milk Samples, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1231-1238.

Findlay, J. W. A., Dillard, R. F., Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays, *AAPTS J.* **2007**, *9*, E260-E267.

Ford, T. E., Microbial Safety of Drinking Water: Unites States and Global Perspectives, *Environ. Health Persp.* **1999**, *107*, 191-206.

Fosse, J., Seegers, H., Magras, C., Foodborne Zoonoses due to Meat: A Quantitative Approach for a Comparative Risk Assessment Applied to Pig Slaughtering in Europe, *Vet. Res.* **2008**, *39*:01.

Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M. T., Perez-Gracia, M. T., Occupational Exposure to Hepatitis E Virus (HEV) in Swine Workers, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 1012-1015.

Gao, Y., Hu, G., Lin, F. Y. H., Sherman, P. M., Li, D., An Electrokinetically-controlled Immunoassay for Simultaneous Detection of Multiple Microbial Antigens, *Biomed. Microdevices* **2005**, *7*, 301-312.

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz IfSG), 20.07.2000.

Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz TierGesG), 22.05.2013.

Glaser, R. W., Antigen-antibody Binding and Mass Transport by Convection and Diffusion to a Surface: A Two-dimensional Computer Model of Binding and Dissociation Kinetics, *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 152-161.

Graham, J. P., Leibler, J. H., Price, L. B., Otte, J. M., Pfeiffer, D. U., Tiensin, T., Silbergeld, E. K., The Animal-Human Interface and Infectious Disease in Industrial Food Animal Production: Rethinking Biosecurity and Biocontainment, *Public Health Rep.* **2008**, *123*, 282-299.

Guidelines for the Validation of Screening Methods for Residues of Veterinary Medicines, Community Reference Laboratories Residues, 20.01.**2010**.

Gurtler, M., Alter, T., Kasimir, S., Linnebur, M., Fehlhaber, K, Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Fattening Pigs, *J. Food Protect.* **2005**, *68*, 850-854.

Gutmann, O., Kuehlewein, R., Reinbold, S., Niekrawietz, R., Steinert, C. P., de Heij, B., Zengerle, R., Daub, M., A Highly Parallel Nanoliter Dispenser for Microarray Fabrication, *Biomed. Microdevices* **2004**, *6*, 131-137.

Haab, B. B., Methods and Application of Antibody Microarrays in Cancer Research, *Proteomics* **2000**, *3*, 2116-2122.

Halbur, P. G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M. B., Purcell, R. H., Emerson, S. U., Toth, T. E., Meng, X.-J., Comparative Pathogenesis of Infection of Pigs with Hepatitis E Viruses Recovered from a Pig and a Human, *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 918-923.

Han, Y., Mayer, D., Offenhäuser, A., Ingebrandt, S., Surface Activation of Thin Silicon Oxides by Wet Cleaning and Silanization, *Thin Solid Films* **2006**, *510*, 175-180.

Henares, T. G., Mizutani, F., Hisamoto, H., Current Developments in Microfluidic Immunosensing Chips, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *611*, 17-30.

Herne, T. M., Tarlov, M. J., Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916-8920.

Heyries, K. A., Loughran, M. G., Hoffmann, D., Homsy, A., Blum, L. J., Marquette, C. A., Microfluidic Biochip for Chemiluminescent Detection Allergen-specific Antibodies, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1812-1818.

Homola, J., Yee, S. S., Gauglitz, G., Surface Plasmon Resonance Sensors: Review, *Sensor. Acuat. B-Chem.* **1999**, *54*, 3-15.

Huang, R., Li D., Wei S., Li, Q., Yuan, X., Geng, L., Cell Culture of Sporadic Hepatitis E Virus in China, *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **1999**, *6*, 729–733.

Huang, X., Ren, J., Gold Nanoparticles Based Chemiluminescent Resonance Energy Transfer for Immunoassay of Alpha Fetoprotein Cancer Marker, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *686*, 115-120.

Hübner, M., Wutz, K., Szkola, A., Niessner, R., Seidel M., A Glyco-chip for the Detection of Ricin by an Automated Chemiluminescence Read-out System, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 461-466.

Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M., Campylobacters as Zoonotic Pathogens: A Food Production Perspective, *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *117*, 237-257.

Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M., Bendall, R. P., Cramp, M. E., Cunningham, R., Non-travel-associated Hepatitis E in England and Wales: Demographic, Clinical, and Molecular Epidemiological Characteristics, *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1166–72.

Jaaskelainen, A.J., Moilanen, K., Buhler, S., Lappalainen, M., Vapalahti, O., Vaheri, A., Piiparinen, H., Serological Microarray for Detection of HSV-1, HSV-2, VZV, and CMV Antibodies, *J. Virol. Methods* **2009**, *160*, 167-171.

Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mileczarski, E., Rai, B., Efficiency of Blocking of Non-specific Interaction of Different Proteins by BSA Adsorbed on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces, *J. Colloid Interf. Sci.* **2010**, *341*, 136-142.

Joos, T. O., Schrenk, M., Höpfl, P., Kröger, K., Chowdhury, U., Stoll, D., Schörner, D., Dürr, M., Herick, K., Rupp, S., Sohn, K., Hämmerle, H., A Microarray Enzyme-linked Immunoassay for Autoimmune Diagnostics, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2641-2650.

Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J. B., Elm, J., Glass, G. E., Higa, H., Diwan, A., Evidence for widespread Infection of Wild Rats with Hepatitis E Virus in the United States, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*, 331-335.

Kaci, S., Noeckler, K., Johne, R., Detection of Hepatitis E Virus in Archived German Wild Boar Serum Samples, *Vet. Microbiol.* **2008**, *128*, 380-385.

Kanda, V., Kariuki, J. K., Harrision, D. J., McDermott, M. T., Label-free Reading of Microarray-based Immunoassays with Surface Plasmon Resonance Imaging, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7257-7262.

Kandimalla, V. B., Neeta, N. S., Karanth, N. G., Thakur, M. S., Roshini, K. R., Rani, B. E. A., Pasha, A., Karnath, N. G. K., Regeneration of Ethyl Parathion Antibodies for Repeated Use in Immunosensor: A Study on Dissociation of Antigens from Antibodies, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 903-906.

Kannan, B., Castelino, K., Chen, F.F., Majumdar, A., Lithographic Techniques and Surface Chemistries for the Fabrication of PEG-passivated Protein Microarrays, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1960-1967.

Karsunke, X. Y. Z., Pschenitza, M., Rieger, M., Weber, E., Niessner, R., Knopp, D., Screening and Characterization of New Monoclonal Anti-Benzo[a]pyrene Antibodies Using Automated Flow-Through Microarray Technology, *J. Immunol. Methods* **2011**, *371*, 81-90.

Kazachkov, Y. A., Balayan, M. S., Ivannikova T. A., Panina, L. I., Orlova, T. M., Zamyatina, N. A., Kusov, Y. Y., Hepatitis E Virus in Cultivated Cells, *Arch. Virol.* **1992**, *127*, 399-402.

- Kim**, D.-K., Kerman, K., Saito, M., Sathuluri, R. R., Endo, T., Yamamura, S., Kwon, Y.-S., Tamiya, E., Label-free DNA Biosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance Coupled with Interferometry, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1855-1864.
- Kitabatake**, N., Doi, E., Surface Tension and Foaming of Protein Solutions, *J. Food Sci.* **1982**, *47*, 1218-1221.
- Kloth**, K., Niessner, R., Seidel, M., An Open Stand-alone Platform for Regenerable Automated Microarrays, *Biosens. Bioelectron.* **2009 a**, *24*, 2106-2112.
- Kloth**, K., Rye-Johnsen, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M., A Regenerable Immuno chip for the Rapid Determination of 13 Different Antibiotics in Raw Milk, *Analyst* **2009 b**, *134*, 1433–1439.
- Knauer**, M., Ivleva, N. P., Liu, X.-J., Niessner, R., Haisch, S., Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Label-Free Microarray Readout for the Detection of Microorganisms, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2766-2772.
- Knecht**, B. G., Strasser, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Weller, M., Automated Microarray System for the Rapid and Simultaneous Detection of Antibiotics in Milk, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 646-654.
- Köhler**, G, Milstein, C., Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- Korf**, U., Wiemann, S., Protein Microarrays as a Discovery Tool for Studying Protein-Protein Interactions, *Exp. Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 13-26.
- Krumbholz**, A., Mohn, U., Lange, J., Motz, M., Wenzel, J. J., Jilg, W., Walther, M., Straube, E., Wutzler, P., Zell, R., Prevalence of Hepatitis E Virus-specific Antibodies in Humans with Occupational Exposure to Pigs, *Med. Microbiol. Immun.* **2012**, *201*, 239-244.

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S. X., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J., A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome, *New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953-1966.

Kusnezow, W., Hoheisel, J. D., Solid Supports for Microarray Immunoassays, *J. Mol. Recognit.* **2003 a**, *16*, 165-176.

Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F., Hoheisel, J. D., Antibody Microarrays: An Evaluation of Production Parameters, *Proteomics* **2003 b**, *3*, 254-264.

Kusnezow, W., Syagailo, Y. V., Goychuk, I., Hoheisel, J. D., Wild, D. G., Antibody Microarrays: The Crucial Impact of Mass Transport on Assay Kinetics and Sensitivity, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 111-124.

Langer, V., Niessner, R., Seidel, M., Stopped-flow Immunoassay for the Detection of Viable *E. coli* by Chemiluminescence Flow-through Microarrays, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1041-1050.

Langer, V., Hartmann, G., Niessner, R., Seidel, M., Rapid Quantification of Bioaerosols Containing *L. pneumophila* by Coriolis μ ® Air Sampler and Chemiluminescence Antibody Microarrays, *J. Aerosol Sci.* **2012**, *48*, 46-55.

Lee, C.-S., Kin, B.-G., Improvement of Protein Stability in Protein Microarrays, *Biotech. Letters* **2002**, *24*, 839-844.

Lee, Y.-G., Chang, K.-S., Application of a Flow Type Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Real Time Determination of Cattle Bovine Ephemeral Fever Virus in Liquid, *Talanta* **2005**, *65*, 1335-1342.

Lengger, S., Otto, J., Schneider, T., Tihm, A., Fleischer, J., Niessner, R., Siedel, M., Oligonucleotide Microarray Chip for the Multiplexed Quantification of Viruses on the Analysis Platform MCR 3, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *submitted*.

Lequin, R. M., Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-linked Immunoassay (ELISA), *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2415-2418.

Liebermann, T., Knoll, W., Parallel Multispot Detection of Target Hybridization to Surface-Bound Probe Oligonucleotides of Different Base Mismatch by Surface-Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Microscopy, *Langmuir* **2003**, *19*, 1567-1572.

Li, J.-M., Wei, C., Ma, W.-F., Multiplexed SERS Detection of DNA Targets in a Sandwich-hybridization Assay Using SERS-encoded Core-shell Nanospheres, *J. Mat. Chem.* **2012**, *22*, 12100-12106.

Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., Moldenhauer, G., Of Mice and Men: Hybridoma and Recombinant Antibodies, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 364-370.

Lu, L., Li, C., Hagedorn, C. H., Phylogenetic Analysis of Global Hepatitis E Virus Sequences: Genetic, Diversity, Subtypes and Zoonosis, *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 5-36.

Luo, Y., Chen, M., Wen, Q. J., Zhao, M., Zhang, B., Li, X. Y., Wang, F., Huang, Q., Yao, C. Y., Jiang, T. L., Cai, G. R., Fu, W. L., Rapid and Simultaneous Quantification of 4 Urinary Proteins by Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance Immunosensor Array, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 2273-2280.

Mansuy, J. M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., Kamar, N., Rostaing, L., Alric, L., Moreau, J., Peron, J. M., Izopet, J., Acute Hepatitis E in South-west France over a 5-year Period, *J. Clin. Virol.* **2009**, *44*, 74-77.

Manz, A., Pamme, N., Jossifidis, D., *Bioanalytical Chemistry*, Imperial College Press: London, UK, **2004**.

Marquette, C. A., Blum, L. J., Application of the Luminol Chemiluminescent Reaction in Analytical Chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006 a**, 385, 546-554.

Marquette, C. A., Blum, L. J., State of the Art and Recent Advance in Immunanalytical Systems, *Biosens. Bioelectron.* **2006 b**, 21, 1424-1433.

Martinez, N. A., Schneider, R. J., Messina, G. A., Raba, J., Modified Paramagnetic Beads in a Microfluidic System for the Determination of Ethinylestradiol (EE2) in River Water samples, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 1376-1381.

Masuda, J. I., Yano, K., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., Kohno, S., Acute Hepatitis E of a Man who Consumed Wild Boar Meat prior to the Onset of Illness in Nagasaki, Japan - Case Report, *Hepatol. Res.* **2005**, 31, 178-183.

Macpherson, C. N. L., Human Behaviour and the Epidemiology of Parasitic Zoonoses, *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1319-1331.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R. K., Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2, *Nature* **2001**, 413, 852-856.

Mendoza, L. G., McQuary, P., Mongan, A., Gangadharan, R., Brignac, S., Eggers, M., *Biotechniques* **1999**, 27, 778-788.

Meng, X.-J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J., Emerson, S. U., A Novel Virus in Swine is closely Related to the Human Hepatitis E Virus, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 9860-9865.

Meng, X.-J., Halbur, P. G., Haynes, J. S., Tsareva, T. S., Bruna, J. D., Royer, R. L., Purcell, R. H., Emerson, S. U., Experimental Infection of Pigs with the newly Identified Swine Hepatitis E Virus (Swine HEV), but not with Human Strains of HEV, *Arch. Virol.* **1998**, *143*, 1405-1415.

Meng, X.-J., Dea, S., Engle, R.E., Friendship, R., Lyoo, Y. S., Sirinarumitr, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R. H., Emerson, S. U., Prevalence of Antibodies to the Hepatitis E Virus in Pigs from Countries where Hepatitis E is Common or is Rare in the Human Population, *J. Med. Virol.* **1999**, *59*, 297-302.

Meng, X.-J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and other Countries, *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 117-122.

Meng, X.-J., Lindsay, D. S., Sriranganathan, N., Wild Boars as Sources for Infectious Diseases in Livestock and Humans, *Philos. T. Roy. Soc. B* **2009**, *364*, 2697-2707.

Meng, X.-J., From Barnyard to Food Table: The Omnipresence of Hepatitis E Virus and Risk for Zoonotic Infection and Food Safety, *Virus Res.* **2011**, *161*, 23-30.

Mills, J. N., Gage, K. L., Khan, A. S., Potential Influence of Climate Change on Vector-Borne and Zoonotic Diseases: A Review and Proposed Research Plan, *Environ. Health Persp.* **2010**, *118*, 1507-1514.

Moreno-Bondi, M. C.; Taitt, C. R.; Shriver-Lake, L. C.; Ligler, F. S., Multiplexed Measurement of Serum Antibodies Using an Array Biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1880-1886.

Morse, S. S., Factors in the Emergence of Infectious Diseases, *Emerg. Infect. Dis.* **1995**, *1*, 7-15.

Moses, S., Brewer, S. H., Lowe, L. B., Characterization of Single- and Double-stranded DNA on Gold Surfaces, *Langmuir* **2004**, *20*, 11134-11140.

Mushahwar, I. K., Hepatitis E Virus: Molecular Virology, Clinical Features, Diagnosis, Transmission, Epidemiology, and Prevention, *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 646-658.

Nielsen, U. B., Geierstanger, B. H., Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, *J. Immunol. Methods* **2004**, *290*, 107-120.

Niu, Y., Jin, G., Protein Microarray Biosensors Based on Imaging Ellipsometry Techniques and their Applications, *Protein Cell* **2011**, *2*, 445-455.

North, S. H., Lock, E. H., Taitt, C. R., Walton, S. G., Critical Aspects of Biointerface Design and their Impact on Biosensor Development, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 925-933.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., Yoshikawa, A., Analysis of the Complete Genome of Indigenous Swine Hepatitis E Virus Isolated in Japan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 929-936.

Okamoto, H., Hepatitis E Virus Cell Culture Models, *Virus Res.* **2011**, *161*, 65-77.

Okamoto, T., Suzuki, T., Yamamoto, N., Micoarray Fabrication with Covalent Attachment of DNA Using Bubble Jet Technology, *Nat. Biotech.* **2000**, *18*, 438-441.

Olaru, A., Gheroghiu, S.D., Polonschii, C., Gheroghiu, E., Quality Assessment of SPR Sensor Chips; Case Study on L1 Chips, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 77-81.

Olsen, B. R., Axelsson-Olsson, D., Thelin, A.; Weiland, O., Unexpected High Prevalence of IgG-antibodies to Hepatitis E Virus in Swedish Pig Farmers and Controls, *Scand. J. Infect. Dis.* **2006**, *38*, 55-58.

Oporto, B., Esteban, J. I., Aduriz, G., Juste, R. A., Hurtado, A., Prevalence and Strain Diversity of Thermophilic Campylobacters in Cattel, Sheep and Swine Farms, *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 977-984.

Oswald, S., Karsunke, X. Y. Z., Dietrich, R., Maertlbauer, E., Niessner, R., Knopp, D., Automated Regenerable Microarray-based Immunoassay for Rapid Parallel Quantification of Mycotoxins in Cereals, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6405-6415.

Owolodun, O. A., Gimenez-Lirola, L. G., Gerber, P., Sansford, B. J., Feagins, A. R., Meng, X.-J., Halbur, P. G., Oprriessning, T., Development of a Fluorescent Microbead-based Immunoassay fort the Detection of Hepatitis E Virus IgG Antibodies in Pigs and Comparison to an Enyzme-linked Immunoassay, *J. Virol. Methods* **2013**, *193*, 278-283.

Panda, S. K., Thakral, D., Rehmann, S., Hepatitis E Virus, *Rev. Med. Virol.* **2007**, *17*, 151-180.

Parvez, M. H., Purcell, R. H., Emerson S. U., Hepatitis E Virus ORF2 Protein Over-expressed by Baculovirus in Hepatoma Cells, Efficiently Encapsidates and Transmits the Viral RNA to Naïve Cells, *Virol. J.* **2011**, *8*, 159-164.

Pasche, S., Voroz, J., Griessner, H. J., Spencer, N. D., Textor, M., Effects of Ionic Strength and Surface Charge on Protein Adsoprtion at PEGylated Surfaces, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 17545-17552.

Pavio, N., Meng, X.-J., Renou, C., Zoonotic Hepatitis E: Animal Reservoirs and Emerging Risks, *Vet. Res.* **2010**, *41*:46.

Payne, C. J., Ellis, T. M., Plant, S. L., Gregory, A. R., Wilcox, G. E., Sequence Data Suggests Big Liver and Spleen Disease Virus (BLSV) is Genetically Related to Hepatitis E Virus, *Vet. Microbiol.* **1999**, *68*, 119-125.

Peluso, P., Wilson, D. S., Do, D., Tran, H., Venkatasubbaiah, M., Quincy, D., Heidecker, B., Poindexter, K., Tolani, N., Phelan, M., Witte, K., Jung., L.S., Wagner, E, and Nock, S., Optimizing Antibody Immobilization Strategies for the Construction of Protein Microarrays, *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 113-124.

Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedber, B., Gauglitz, G., A High-Density Poly(ethylene glycol) Polymer Brush for Immobilization on Glass-type Surfaces, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 473-481.

Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., Girones, R., HEV Identified in Serum from Humans with Acute Hepatitis and in Sewage of Animal Origin in Spain, *J. Hepatol.* **2000**, *33*, 826-833.

Purcell, R. H., Emerson S. U., Hepatitis E: An Emerging Awareness of an Old Disease, *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 494-503.

Quist, A. P., Pavlovic, E., Oscarsson, S., Recent Advances in Microcontact Printing, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 591-600.

Raem, A. M., Rauch, P. (Hrsg.), *Immunoassays*, Spektrum Akademischer Verlag: München **2007**.

Redmond, E. C., Griffith, C. J., Consumer Food Handling in the Home: A Review of Food Safety Studies, *J. Food Prot.* **2003**, *66*, 130-161.

Richtlinie 92/117/EWG des Rates über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen, 17.12.1992.

Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates, 17.11.2003.

Rieger, M., Cervino, C., Saucedo, J., Niessner, R., Knopp, D., A Highly Efficient Hybridoma Screening Technique Using Capture Antibody Based Microarrays, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2373-2377.

RKI, Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2012, 01.03.2013, *Download* von http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/jahrbuch_node.html (letzter Aufruf am 09.07.2013).

Robelek, R., Niu, L., Schmid, E. L., Knoll, W., Multiplexed Hybridization Detection of Quantum Dot-conjugated DNA Sequences Using Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Microscopy and Spectrometry, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6160-6165.

Robinson, R. A., Burgess, W. H, Emerson, S. U., Leibowitz, R. S., Sosnovtseva, S. A., Tsarev, S., Purcell, R. H., Structural Characterization of Recombinant Hepatitis E Virus ORF2 Proteins in Baculovirus-infected Insect Cells, *Protein Expres. Purif.* **1998**, *12*, 75-84.

Roda, A., Guardigli, M., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., Musiani, M., Bio- and Chemiluminescence Imaging in Analytical Chemistry, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *541*, 25-35.

Roda, A., Guardigli, M., Analytical Chemiluminescence and Bioluminescence: Latest Achievements and New Horizons, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 69-76.

Rodriguez-Mozaz, S., Lopez del Alda, J., Barcelo, D., Biosensors as Useful Tools for Environmental Analysis and Monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1025-1041.

Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F., Pavio, N., High Prevalence of Hepatitis E Virus in French Domestic Pigs, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *34*, 419-427.

Rosner, B. M., Stark, K., Werber, D., Epidemiology of Reported *Yersinia enterocolitica* Infections in Germany, 2001-2008, *BMC Public Health* **2010**, *10*:8.

Rutjes, S. A., Lodder, W. J., Bouwknecht, M., de Roda Husman, A. M., Increased Hepatitis E Virus Prevalence on Dutch Pig Farms from 33 to 55 % by Using Appropriate Internal Quality Controls for RT-PCR, *J. Virol. Methods* **2007**, *143*, 112-116.

Rutjes, S. A., Lodder-Verschoor, F., Lodder, W. J., van der Giessen, J., Reesink, H., Bouwknecht, M., de Roda Husman, A. M., Seroprevalence and Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Wild Boar and Red Deer in The Netherlands, *J. Virol. Methods* **2010**, *168*, 197-206.

Ryan, C. P., Zoonoses Likely to Be Used in Bioterrorism, *Public Health Rep.* **2008**, *123*, 276-281.

Sauceda-Friebe, J., Karsunke, X. Y. Z., Vazac, S., Biselli, S., Niessner, R., Knopp, D., Regenerable Immuno-Biochip for Ochratoxin A Determination in Green Coffee Using an Automated Microarray Chip Reader with Chemiluminescence Detection, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 234-242.

Schäferling, M., Nagl, S., Optical Technologies for the Read Out and Quality Control of DNA and Protein Microarrays, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 500-517.

Schena, M., Shalon, D., Davies, R. W., Brown, P. O., Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns with a Complementary-DNA Microarray, *Science* **1995**, *270*, 467-470.

Schlapak, R., Pammer, P., Armitage, D., Zhu, R., Hinterdorfer, P., Glass Surfaces Grafted with High-Density Poly(ethylene glycol) as Substrates for DNA Oligonucleotide Microarrays, *Langmuir* **2006**, *22*, 277-285.

Schlauder, G. G., Desai, S. M., Zanetti, A. R., Tassopoulos, N. C., Mushahwar, I. K., Novel Hepatitis E Virus (HEV) Isolates from Europe: Evidence for Additional Genotypes of HEV, *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 243-251.

Schotten, A., Menges, B., Juebner, M., Rothschild, M. A., Bender, K., A mixed Alkanethiol Based Immunosensor for Surface Plasmon Field-enhanced Fluorescence Spectroscopy in Serum, *Analyst* **2013**, *138*, 1705-1712.

Schweinehaltungshygieneverordnung (SchHaltHyg) des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 07.06.1999.

Seidel, M., Niessner, R., Automated Analytical Microarrays: A Critical Review, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1521-1546.

Seidel, M., Niessner, R., Chemiluminescence to Immunoassays, In *Chemiluminescence and Bioluminescence*; Roda, A., (Hrsg.); Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., **2010**; pp 291–335.

Seurynck-Servoss, S. L., White, A.M., Baird C. L., Rodland, K.D., Zangar, R.C., Evaluation of Surface Chemistries for Antibody Microarrays, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *371*, 105-115.

Shen, L., Guo, A., Zhu X., Tween Surfactants: Adsorption, Self-organization & Protein Resistance, *Surf. Sci.* **2001**, *605*, 494-499.

Shrestha, M. P., Scott, R.M, Joshi, D. M., Mammen, P. Jr., Thapa, G. B., Thapa, N., Myint, K. S. A., Fourneau, M., Kuschner, R. A., Shrestha, S. K., David, M. P., Seriwatana, J., Vaughn, D. W., Safary, A, Endy, T., Innis, B. L., Safety and Efficacy of a Recombinant Hepatitis E Vaccine, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 895-903.

Shriver-Lake, L. C., Donner, B., Edelstein, R., Breslin, K., Bhatia, S. K., Ligler, F. S., Antibody Immobilization Using Heterobifunctional Crosslinkers, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1101-1106.

Skelley, D. S., Brown, L. P., Besch, P. K., Radioimmunoassay, *Clin. Chem.* **1973**, *19*, 146-186.

Smith, D. S., Eremin, S. A., Fluorescence Polarization Immunoassays and Related Methods for Simple, High-throughput Screening of Small Molecules, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1499-1507.

Sofos, J. N., Challenges to Meat Safety in the 21st Century, *Meat Sci.* **2008**, *78*, 3-13.

Stefani, M., Protein Folding and Misfolding on Surfaces, *Inter. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2515-2542.

Steinitz, M., Quantitation of the Blocking Effect of Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA Microwells, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 232-238.

Stoll, D., Templin, M. F., Bachmann, J., Protein Microarrays: Applications and Future Challenges, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **2005**, *8*, 239-252.

Surjit, M., Jameel, S., Lal, S. K., The ORF2 Protein of Hepatitis E Virus binds the 5' Region of viral RNA, *J. Virol.* **2004**, *78*, 320-328.

Szkola, A., Campbell, K., Elliott, C. T., Niessner, R., Seidel, M., Automated, High Performance, Flow-through Chemiluminescence Microarray for the Multiplexed Detection of Phycotoxins, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *797*, 211-218.

Taitt, C. R., Anderson, G. P., Ligler, F. S., Evanescent Wave Fluorescence Biosensors, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2470-2487.

Taitt, C. R., Shriver-Lake, L. C., Ngundi, M. N., Ligler, F. S., Array Biosensor for Toxin Detection: Continued Advances, *Sensors* **2008**, *8*, 8361-8377.

Tam, A. W., Smith M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K.E., Reyes, G. R., Hepatitis E Virus (HEV): Molecular Cloning and Sequencing of the Full-Length Viral Genome, *Virology* **1991**, *185*, 120-131.

Tamada, Y., Yano, K., Yatsunami, H., Inoue, O., Mawatari, F., Ishibashi, H., Consumption of Wild Boar Linked to Cases of Hepatitis E, *J. Hepatol.* **2004**, *40*, 869-870.

Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., Development and Evaluation of an Efficient Cell-culture System for Hepatitis E Virus, *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 903-911.

Tate, J., Ward, G., Interferences in Immunoassay, *Clin. Biochem. Rev.* **2004**, *25*, 105-120.

Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., Weiss, L. M., Toxoplasma gondii: From Animals to Humans, *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1217-1258.

Teo, C. G., Much Meat, Much Malady: Changing Perceptions of the Epidemiology of Hepatitis E, *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 24-32.

Teo, C. G., Fatal Outbreaks of Jaundice in Pregnancy and the Epidemic History of Hepatitis E, *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 767-787.

Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Kapikian, A. Z., Ticehurst, J., London, W., Purcell, R. H., ELISA for Antibody to Hepatitis E Virus (HEV) Based on Complete Open-Reading Frame-2 Protein Expressed in Insect Cells: Identification of HEV Infection in Primates, *J. Infect. Dis.* **1993**, *168*, 369-378.

Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J. L., Purcell, R. H., Recombinant Vaccine Against Hepatitis E: Dose Response and Protection Against heterologous Challenge, *Vaccine* **1997**, *15*, 1834-1838.

Tschmelak, J., Käppel, N., Gauglitz, G., TIRF-based Biosensor for Sensitive Detection of Progesterone in Milk Based on Ultra-sensitive Progesterone Detection in Water, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005 a**, *382*, 1895-1903.

Tschmelak, J., Proll, G., Riedt, J., Kaiser, J., Kraemmer, P., Barzaga, L., Wilkinson, J. S., Hua, P., Hole, J. P., Nudd, R., Jackson, M., Abuknesha, R., Barcelo, D., Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L., Sacher, F., Stien, J., Slobodnik, J., Oswald, P., Kozmenko, H., Korenkova, E., Tothova, L., Krascenits, Z., Gauglitz, G., Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS), *Biosens. Bioelectron.* **2005 b**, 20, 1499-1519.

Tsunoda, M., Chemiluminescence Detection with Separation Techniques for Bioanalytical Applications, *Bioanal. Rev.* **2009**, 1, 25-34.

Uttamchandani, M., Neo, J. L., Ong, B. N. Z., Moochala, S., Applications of Micorarrays in Pathogen Detection and Biodefense, *Trends Biotech.* **2009**, 27, 53-61.

Verordnung (EG) Nr. 1244/2007 der Kommission zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2474/2005 hinsichtlich der Durchführungsmaßnahmen für bestimmte Erzeugnisse tierischen Ursprungs, die zum menschlichen Verzehr bestimmt sind, und zur Festlegung spezifischer Bestimmungen über amtliche Kontrollen zur Fleischuntersuchung, 24.10.2007.

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über Lebensmittelhygiene, 29.04.2004.

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, 29.04.2004.

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs, 29.04.2004.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, 15.11.2005.

Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern, 17.11.2003.

Vollmer, T., Diekmann, J., Johne, R., Eberhardt, M., Knabbe, C., Dreier, J., Novel Approach for Detection of Hepatitis E Virus Infection in German Blood Donors, *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2708-2713.

Wacheck, S., Werres, C., Mohn, U., Dorn, S., Soutschek, E., Fredriksson-Ahomaa, M., Maertlbauer, E., Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples From Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany, *Foodborne Path. Dis.* **2012**, *9*, 655-660.

Wan, J., Thomas, M. S., Guthrie, S., Vullev, V. I., Surfac-Bound Proteins with Preserved Functionality, *Ann. Biomed. Engin.* **2009**, *37*, 1190-1205.

Wang, L., Li, P. C. H., Microfluidic DNA Microarray Analysis: A Review, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *687*, 12-27.

Wang, Y., Knoll, W., Dostalek, J., Bacterial Pathogen Surface Plasmon Resonance Biosensor Advanced by Long Range Surface Plasmons and Magnetic Nanoparticle Assays, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8345-8350.

Webster, R. G., Peiris, M., Chen, H., Guan, Y., H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza, *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 3-8.

Weimer, B. C., Walsh, M. K., Wang, X., Influence of a Poly-ethylene Glycol Spacer on Antigen Capture by Immobilized Antibodies, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *45*, 211-219.

Weller, M., Schuetz, A., Winklmaier, M., Niessner, R., Highly Parallel Affinity Sensor for the Detection of Environmental Contaminants in Water, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 29-41.

Wenzel, J. J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., Jilg, W., Test Performance Characteristics of anti-HEV IgG Assays Strongly Influence Hepatitis E Seroprevalence Estimates, *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 497-500.

Wenzel, J. J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., Plentz, A., Jilg, W., Detection of Hepatitis E Virus (HEV) from Porcine Livers in Southeastern Germany and High Sequence Homology to Human HEV Isolates, *J. Clin. Virol.* **2011**, 52, 50-54.

WHO, *Waterborne Zoonoses – Identification, Causes, and Control*, Cotuvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. G., Fayer, R., Gannon, V. P. J., Eds.; IWA Publishing: London, UK **2004**.

Wijesuriya, D., Breslin, K., Anderson, G., Shriver-Lake, L., Ligler, F.S., Regeneration of Immobilized Antibodies on Fiber Optic Probes, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 585-592.

Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., Preparation and Characterization of Functional Poly(ethylene glycol) Surfaces for the Use of Antibody Microarrays, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4529-4537.

Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., Detection of Escherichia coli 0157: H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in Water Using a Flow-Through Chemiluminescence Microarray Readout System, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5854-5863.

Worm, H. C., Wirnsberger, G., Hepatitis E Vaccines – Progress and Prospects, *Drugs* **2004**, 64, 1517-1531.

Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M., Simultaneous Determination of four Different Antibiotic Residues in Honey by Chemiluminescence Multianalyte Chip Immunoassays, *Microchim. Acta* **2011**, 173, 1-9.

Xu, D. K., Xu, D. W., Yu, X. B., Liu, Z. H., He, W., Ma, Z. Q., Label-free Electrochemical Detection for Aptamer-based Array Electrodes, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 5107-5113.

Yakovleva, J., Davidsson, R., Bengtsson, M., Laurell, T., Emneus, J., Microfluidic Enzyme Immunosensors with Immobilised Protein A and G Using Chemiluminescence Detection, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 19, 21-34.

Yalcin, A., Damin, F., Ozkumur, E., Di Carlo, G., Goldberg, B.B., Chiari, M., Unlu, M.S., Direct Observation of Conformation of a Polymeric Coating with Implications in Microarray Applications, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 625-630.

Yamashita, T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng R. H., Yoshimura M., Unno H., Shima R, Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., Matsuura Y., Biological and Immunological Characteristics of Hepatitis E Virus-like Particles Based on the Crystal Structure, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 12986-12991.

Yang, Z., Zong, C., Yan, F., Ju, H., Automated Chemiluminescent Dual-analyte Immunoassay Based on Resolved Immunosensing Channels, *Talanta* **2010**, *82*, 1462-1467.

Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahasi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H., Sporadic Acute or Fulminant Hepatitis E in Hokkaido, Japan, May be Food-borne, as Suggested by the Presence of Hepatitis E Virus in Pig Liver as Food, *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2351-2357.

Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K., Jameel, S., The ORF3 Protein of Hepatitis E Virus is a Phosphoprotein that Associates with the Cytoskeleton, *J. Virol.* **1997**, *71*, 9045-9053.

Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T. J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A., Wang, Y., A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China, *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 137-1379.

Zhou, Y.-H., Purcell, R. H., Emerson, S.U., A truncated ORF2 Protein Contains the most Immunogenic Site on ORF2: Antibody Responses to Non-vaccine Sequences Following Challenge of Vaccinated and Non-vaccinated Macaques with Hepatitis E Virus, *Vaccine* **2005**, *23*, 3157-3165.

Zhu, H., Snyder, M., Protein Chip Technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 55-63.

9 Anhang

Anhang A: Darstellung des Messprogramms zum Nachweis von Serumantikörpern.

| Schritt | Befehl | Beschreibung | |
|---------|--------------------------------|--|--|
| 10 | Block Start | Referenzierung der Ventile (Position 1) | |
| 20 | V1 ref | | |
| 30 | V2 ref | | |
| 40 | V3 ref | | |
| 50 | V5P3 rechts | | |
| 60 | V4 ref | | |
| 70 | V6 ref | | |
| 80 | Block Ende | | |
| 90 | Block Start | Referenzierung der Pumpen (Position oben/leer) | |
| 100 | P2 ref | | |
| 110 | P3 ref | | |
| 120 | P4 ref | | |
| 130 | P5 ref | | |
| 140 | Block Ende | | |
| 150 | Block Start | Schleifenstart Programm | |
| 160 | Block Start | <p>Laufpuffer aufziehen</p> <p>V6 auf Totposition Einsetzen der Probe V6 auf Wasteposition 100 µL Probe in Waste Stellung V4 vordere Flusszelle Verschaltung V5 mit V6 -> Weg zum Chip</p> <p>200 µL Probe schnell zum Chip 700 µL Probe langsam über Chip Laufpuffer aufziehen</p> <p>mit 1.000 µL Laufpuffer restliche Probe langsam über Chip schieben</p> | |
| 170 | V6P3 rechts | | |
| 180 | P2, Intake 1000 µL (100 µL/s) | | |
| 190 | V6P2 links | | |
| 200 | Meldung Spritze Wechseln | | |
| 210 | V6P1 links | | |
| 220 | P2, Dispense 100 µL (50 µL/s) | | |
| 230 | V4P2 | | |
| 240 | V6P4 rechts | | |
| 250 | V5P5 rechts | | |
| 260 | P2, Dispense 200 µL (100 µL/s) | | |
| 270 | P2, Dispense 700 µL (10 µL/s) | | |
| 280 | V6P3 links | | |
| 290 | P2, Intake 1000 µL (100 µL/s) | | |
| 300 | V6P4 rechts | | |
| 310 | P2, Dispense 1000 µL (10 µL/s) | | |
| 320 | P2 ref | | |
| 330 | Block Ende | | |
| 340 | Block Start | | 50 µL Luminol aufziehen, 2.000 µL Laufpuffer aufziehen |
| 350 | V2P3 rechts | | |
| 360 | V3P3 links | | |
| 370 | P3, Intake 50 µL (299 µL/s) | | |
| 380 | P4, Intake 2000 µL (1000 µL/s) | | |

| | | |
|-----|---------------------------------|--|
| 390 | V2P5 rechts | Verschaltung V2 mit V5 -> Weg zum Chip |
| 400 | V5P1 rechts | |
| 410 | V3P4 rechts | 50 µL H ₂ O ₂ aufziehen, 2.000 µL Laufpuffer über Chip geben |
| 420 | P3, Intake 50 µL (299 µL/s) | |
| 430 | P4, Dispense 2000 µL (500 µL/s) | Weg SekAK zum Chip |
| 440 | V5P4 rechts | |
| 450 | V3P3 links | 50 µL Luminol aufziehen, 200 µL SekAK schnell zum Chip geben |
| 460 | P3, Intake 50 µL (299 µL/2) | |
| 470 | P0, Dispense 200 µL (100 µL/s) | 50 µL H ₂ O ₂ aufziehen, 800 µL SekAK langsam über Chip geben |
| 480 | V3P4 rechts | |
| 490 | P3, Intake 50 µL (299 µL/2) | |
| 500 | P0, Dispense 800 µL (10 µL/s) | |
| 510 | Block Start 8x | |
| 520 | V6P3 rechts | |
| 530 | P2, Intake 1000 µL (250 µL/s) | |
| 540 | V6P1 links | |
| 550 | P2, Dispense 1000 µL (250 µL/s) | 8x Probenspritze mit 1.000 µL Laufpuffer spülen (Weg zum Abfall) |
| 560 | P2 ref | |
| 570 | Block Ende | |
| 580 | Block Ende | |
| 590 | Block Start | |
| 600 | V2P3 rechts | |
| 610 | V3P3 links | 50 µL Luminol aufziehen, 4.000 µL Laufpuffer aufziehen |
| 620 | P3, Intake 50 µL (299 µL/2) | |
| 630 | P4, Intake 4000 µL (1000 µL/s) | Verschaltung V2 mit V5 -> Weg zum Chip |
| 640 | V2P5 rechts | |
| 650 | V5P1 links | 50 µL H ₂ O ₂ aufziehen, 2.000 µL Laufpuffer über Chip geben |
| 660 | V3P4 rechts | |
| 670 | P3, Intake 50 µL (299 µL/2) | |
| 680 | P4, Dispense 2000 µL (500 µL/s) | |
| 690 | Block Ende | 50 µL Luminol aufziehen |
| 700 | Block Start | |
| 710 | V3P3 links | |
| 720 | P3, Intake 50 µL (299 µL/s) | |
| 730 | V3P4 rechts | |
| 740 | P3, Intake 50 µL (299 µL/s) | |
| 750 | V3P2 links | |
| 760 | V5P2 rechts | |
| 770 | P3, Dispense 400 µL (150 µL/s) | |
| 780 | P3 ref | |
| | | 50 µL H ₂ O ₂ aufziehen Verschaltung V3 mit V5 -> Weg zum Chip |
| | | 400 µL Substratgemisch über Chip |

| | | | |
|------|---------------------------------|--|-----------------|
| 790 | V4P1 | Flusszelle schließen 60 s Bildaufnahme Flusszelle öffnen 2.000 µL Laufpuffer über Chip geben | |
| 800 | Kamera 60 s | | |
| 810 | V4P2 | | |
| 820 | V5P1 links | | |
| 830 | P4, Dispense 2000 µL (500 µL/s) | | |
| 840 | P4 ref | | |
| 850 | Block Ende | | |
| 860 | Block Start | | |
| 870 | V5P5 rechts | | Weg P2 zum Chip |
| 880 | Block Ende | | |
| 890 | Block Start 3x | Spülen der Schläuche und des Chips mit Laufpuffer (3x 1.000 µL) | |
| 900 | V6P3 rechts | | |
| 910 | P2, Intake 1000 µL (100 µL/s) | | |
| 920 | V6P4 | | |
| 930 | P2, Dispense 1000 µL (250 µL/s) | | |
| 940 | P2 ref | | |
| 950 | Block Ende | | |
| 960 | Block Start 3x | 2000 µL Laufpuffer aufziehen Verschaltung V2 mit V5 -> Weg zum Chip 2.000 µL Laufpuffer über Chip geben | |
| 970 | V2P3 rechts | | |
| 980 | P4, Intake 2000 µL (1000 µL/s) | | |
| 990 | V5P1 rechts | | |
| 1000 | V2P5 rechts | | |
| 1010 | P4, Dispense 2000 µL (500 µL/s) | | |
| 1020 | P4 ref | | |
| 1030 | Block Ende | | |
| 1040 | Block Ende | Schleifenende Programm | |
| 1050 | Block Start | Messung beendet | |
| 1060 | Buzzer | | |
| 1070 | Meldung Messung beendet | | |
| 1080 | Block Ende | | |

Anhang B: Liste der verwendeten Realseren.

| <i>Probe</i> | <i>Probenahme</i> | <i>Bezeichnung</i> |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| H 01 | 10.09.2009 | Serum 5 |
| H 02 | 03.09.2009 | Serum 1 |
| H 03 | 10.09.2009 | Serum 6 |
| H 04 | 03.09.2009 | Serum 13 |
| H 05 | 03.09.2009 | Serum 8 |
| H 06 | 10.09.2009 | Serum 1 |
| H 07 | 27.08.2009 | Serum 1 |
| H 08 | 13.08.2009 | Serum 2 |
| H 09 | 13.08.2009 | Serum 12 |
| H 10 | 13.08.2009 | Serum 10 |
| H 11 | 03.09.2009 | Serum 3 |
| H 12 | 23.11.2011 | Serum 2 |
| H 13 | 23.11.2011 | Serum 1 |
| H 14 | 13.08.2009 | Serum 4 |
| H 15 | 23.11.2011 | Serum 4 |
| H 16 | 23.11.2011 | Serum 6 |
| H 17 | 13.08.2009 | Serum 13 |
| H 18 | 03.09.2009 | Serum 15 |
| H 19 | 03.09.2009 | Serum 16 |
| H 20 | 27.08.2009 | Serum 5 |
| H 21 | 10.09.2009 | Serum 4 |
| H 22 | 23.11.2011 | Serum 9 |
| H 23 | 23.11.2011 | Serum 3 |
| H 24 | 23.11.2011 | Serum 10 |
| H 25 | 23.11.2011 | Serum 7 |
| H 26 | 23.11.2011 | Serum 5 |
| H 27 | 23.11.2011 | Serum 8 |

| | | |
|------|------------|------------|
| Y 01 | ? | Ulm 72 |
| Y 02 | ? | Ulm 114 |
| Y 03 | 10.09.2009 | Serum 1 |
| Y 04 | 03.09.2009 | Serum 8 |
| Y 05 | ? | Land 60 |
| Y 06 | ? | Wald 71 |
| Y 07 | ? | Schwein 29 |
| Y 08 | 10.09.2009 | Serum 6 |
| Y 09 | 03.09.2009 | Serum 13 |
| Y 10 | ? | Schwein 26 |
| Y 11 | ? | Schwein 7 |
| Y 12 | ? | Ulm 5 |
| Y 13 | ? | Schwein 6 |
| Y 14 | ? | Schwein 11 |
| Y 15 | ? | WAC 132 |
| Y 16 | 27.08.2009 | Serum 1 |
| Y 17 | ? | Schwein 7 |
| Y 18 | ? | MUC 47 |
| Y 19 | ? | WAC 130 |
| Y 20 | ? | MUC 23 |
| Y 21 | ? | MUC 24 |
